

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 44 38 918 A 1

⑤ Int. Cl.⁶:
C 07 H 19/20
A 61 K 31/70
C 07 H 19/04
A 61 K 49/00
C 07 H 1/00

⑳ Aktenzeichen: P 44 38 918.3
㉔ Anmeldetag: 4. 11. 94
㉕ Offenlegungstag: 9. 5. 96

2

DE 44 38 918 A 1

㉚ Anmelder:
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

㉛ Erfinder:
Seela, Frank, Prof. Dr., 49076 Osnabrück, DE;
Thomas, Horst, 49205 Hasbergen, DE

⑤④ Modifizierte Oligonukleotide, deren Herstellung sowie deren Verwendung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue modifizierte Oligonucleotide, die mindestens eine substituierte 7-Desazapurinbase aufweisen und stabilere Hybridisierungskomplexe mit Nukleinsäuren bilden;
Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung als Inhibitoren der Genexpression, als Sonden zum Nachweis von Nukleinsäuren, als Hilfsmittel in der Molekularbiologie und als Arzneimittel oder Diagnostikum.

DE 44 38 918 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue, modifizierte Basen enthaltende Oligonucleotide mit wertvollen physikalischen, biologischen und pharmakologischen Eigenschaften, ein Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung als Inhibitoren der Genexpression (Antisense Oligonukleotide, Ribozyme, Sense Oligonukleotide und Triplex Forming Oligonukleotide), als Sonden zum Nachweis von Nucleinsäuren, als Hilfsmittel in der Molekularbiologie und als Arzneimittel oder Diagnostikum.

Aus der Literatur sind zahlreiche chemische Modifikationen von Oligonukleotiden bekannt. Diese Modifikation können das Zucker-Phosphat-Gerüst oder die Nucleobasen betreffen. Eine Übersicht über den Stand der Technik geben beispielsweise Uhlmann & Peyman, Chem. Rev. 1990, 90, 543 und Milligan et al, J. Med. Chem. 1993, 36, 1923].

Eine chemische Modifikation von Oligonukleotiden ist in der Regel erforderlich, da unmodifizierte Oligonukleotide sehr rasch durch nukleolytische Aktivitäten sowohl in Zellen als auch im Zellkulturmedium abgebaut werden. Die Stabilisierung gegen nucleolytischen Abbau kann durch Ersatz des Zucker-Phosphat-Rückgrats oder durch Modifikation der Phosphatbrücke, des Zuckerbausteins oder der Nucleobase erfolgen [Milligan et al, supra und Uhlmann & Peyman, supra].

Neben Modifikationen, die zu Oligonukleotiden mit einer erhöhten Stabilität gegenüber einem nukleolytischen Abbau führen, sind Modifikationen von Interesse, die das Hybridisierungsverhalten der modifizierten Oligonukleotide dahingehend verändern, daß diese z. B. stabilere Hybridisierungskomplexe (Duplexe) mit intrazellulären Nukleinsäuren (sogenannte Target-Nukleinsäuren) bilden können. Eine Veränderung der Hybridisierungseigenschaften von Oligonukleotiden ist z. B. durch Modifikation der Basen möglich. Die veränderten Hybridisierungseigenschaften solcher modifizierter Oligonukleotide sind z. B. an der — im Vergleich zu den unmodifizierten Oligonukleotiden — veränderten Schmelztemperatur (T_m -Wert) der Duplexe zu erkennen.

So bilden Oligonukleotide, die z. B. 5-Bromuracil enthalten, stabilere Hybridisierungskomplexe mit den komplementären Nukleinsäuren als Oligonukleotide, die die entsprechenden unsubstituierten Basen (Uracil) enthalten [G.D. Fasman, CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd edition, 1975, Nucleic Acids, Vol. I, 58-585].

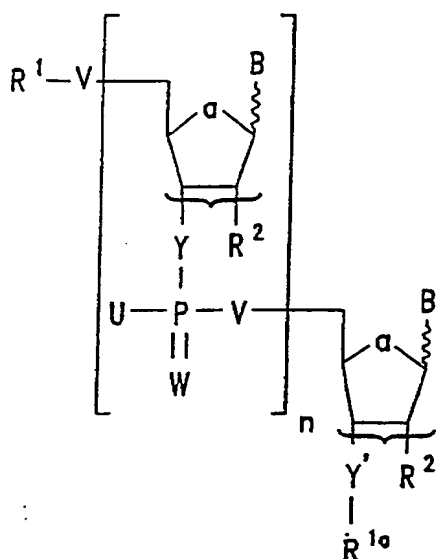
Aus der PCT-Anmeldung WO 93/10820 sind ferner Oligonukleotide bekannt, die modifizierte Uracil- bzw. Cytosinbasen enthalten und im Vergleich zu den nicht modifizierten Oligonukleotiden stabilere Duplex- oder Triplexstrukturen mit den Targetnukleinsäuren ausbilden können. Verbesserte Hybridisierungseigenschaften wurden auch für Oligonukleotide beschrieben, die das Basenalogon 2-Aminoadenin enthalten [Chollet et al, (1988), Nucleic Acid Research, 16, 305—317]. Aus der Deutschen Patentanmeldung P 44 15 370.8 ist bekannt, daß der Einbau von 8-Azapurinbasen in Oligonukleotide die Stabilität der entsprechenden Hybridisierungskomplexe mit den Targetnukleinsäuren erhöht. Aus der PCT-Anmeldung WO 93/09127 sind ferner Oligonukleotide bekannt, die substituierte oder unsubstituierte 7-Desazapurinbasen enthalten und die dadurch leichter Triplexstrukturen mit den Targetmolekülen (Doppelstrang-DNA) bilden können.

Allerdings läßt sich nicht vorhersagen, welche Basenmodifikationen zu einer Erhöhung der Duplexstabilität führen. So sind auch zahlreiche Beispiele von Basenmodifikationen bekannt, die die Duplexstabilität verringern. So werden in der PCT-Anmeldung WO 92/002258 pyrimidin-modifizierte Oligonukleotide beschrieben, die eine verminderte Bindungsaffinität zu der Targetnukleinsäuren aufweisen. Auch verringern Methyl- oder Brom-Substituenten, die an die 8-Position des Purinringes eingeführt werden, die Stabilität der entsprechenden Duplexe [E. N. Kanava et al, Biochemistry (1987) 26 7159, und Biochemistry, 1984, 23, 4219]. 7-Desazaadenin enthaltende Oligonukleotide bilden deutlich weniger stabile Duplexe mit komplementären Oligonukleotiden als Adenin enthaltenden Oligonukleotide [Seela et al, Nucleic Acid Research (1982) 10, 1389].

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, neue Oligonukleotide mit vorteilhaften Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß Oligonukleotide, die mindestens eine substituierte 7-Desazapurinbase aufweisen, deutlich stabilere Hybridisierungskomplexe mit den Targetnukleinsäuren bilden als vergleichbare Oligonukleotide, die unsubstituierte 7-Desazapurinbasen aufweisen.

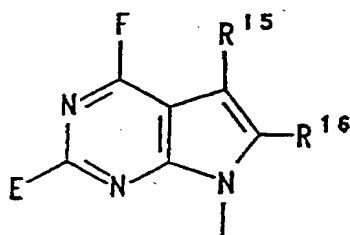
Die Erfindung betrifft somit Oligonukleotide der Formel 1



(I)

sowie deren physiologisch verträglichen Salze worin

B unabhängig voneinander eine in der Nukleotidchemie übliche Base bedeuten und mindestens ein B eine Base der Formel II bedeutet

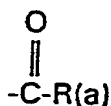


(II)

worin

 R^{15} und R^{16} unabhängig voneinander

1. Wasserstoff
2. Halogen,
3. (C_1-C_{10}) -Alkyl,
4. (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
5. (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
6. NO_2 ,
7. NH_2 ,
8. Cyano,
9. $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl,
10. (C_1-C_6) -Alkoxy
11. (C_6-C_{20}) -Aryloxy
12. SiH_3
- 13.



14. einen wie unter 3, 4, oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, $S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, (C_1-C_6) -Alkoxy, OH, $-NR(c)R(d)$, $-CO-R(b)$, $-NH-CO-NR(c)R(d)$, $-NR(c)R(g)$, $-NR(e)R(f)$, $-NR(e)R(g)$ oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel $-[O-(CH_2)_r-]_s-$ $-NR(c)R(d)$, wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionell Gruppen wie OH, SH, $-CO-R(b)$, $-NH-CO-NR(c)R(d)$, $-NR(c)R(d)$, $-NR(e)R(f)$, $-NR(e)R(g)$ oder $-NR(c)R(g)$ zusätzlich mit einer oder meh-

ren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder

15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet.

R(a) OH, (C₁–C₆)-Alkoxy, (C₆–C₂₀)-Aryloxy, NH₂ oder NH–T bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sind, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonden dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,

R(b) Hydroxyl, (C₁–C₆)-Alkoxy, oder –N(R(c))R(d) bedeutet,

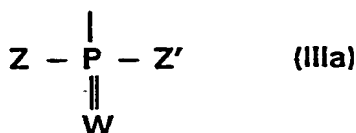
R(c) und R(d) unabhängig voneinander H, (C₁–C₆)-Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit –NR(e)R(f) oder –NR(e)R(g) bedeuten,

R(e) und R(f) unabhängig voneinander H oder (C₁–C₆)-Alkyl bedeuten,

R(g) (C₁–C₆)-Alkyl-COOH bedeutet mit der Maßgabe, daß R¹⁵ und R¹⁶ nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO₂, NH₂, Cyano oder SiH₃ sein können,

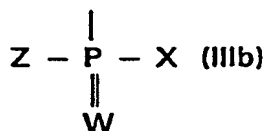
E und F unabhängig voneinander H, OH oder NH₂ bedeuten,

20 R¹ Wasserstoff, C₁–C₁₈-Alkyl, C₂–C₁₈-Alkenyl, C₂–C₁₈-Alkynyl, C₂–C₁₈-Alkylcarbonyl, C₃–C₁₉-Alkenylcarbonyl, C₃–C₁₉-Alkynylcarbonyl, (C₆–C₁₄)-Aryl-(C₁–C₈)-alkyl, eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe oder einen Rest der Formel IIIa



bedeutet;

R^{1a} Wasserstoff, C₁–C₁₈-Alkyl, C₂–C₁₈-Alkenyl, C₂–C₁₈-Alkynyl, C₂–C₁₈-Alkylcarbonyl, C₃–C₁₉-Alkenylcarbonyl, C₃–C₁₉-Alkynylcarbonyl, (C₆–C₁₄)-Aryl-(C₁–C₈)-alkyl, oder einen Rest der Formel IIIb



bedeutet;

R² Wasserstoff, Hydroxy, C₁–C₁₈-Alkoxy, C₁–C₆-Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, Halogen, insbesondere F, Azido oder NH₂ bedeutet;

a für Oxy, Sulfandiyl oder Methylen steht;

n eine ganze Zahl ≥ 1 bedeutet;

W Oxo, Thioxo oder Selenoxo bedeutet;

V Oxy, Sulfandiyl oder Imino bedeutet;

Y Oxy, Sulfandiyl, Imino oder Methylen bedeutet;

Y' Oxy, Sulfandiyl, Imino, (CH₂)_m oder V(CH₂)_m ist, worin

m eine ganze Zahl von 1 bis 18 bedeutet;

X Hydroxy oder Mercapto bedeutet;

U Hydroxy, Mercapto, SeH, C₁–C₁₈-Alkoxy, C₁–C₁₈-Alkyl, C₆–C₂₀-Aryl, (C₆–C₁₄)-Aryl-(C₁–C₈)-alkyl, NHR³, NR³R⁴ oder einen Rest der Formel IV



bedeutet, worin

R³ C₁–C₁₈-Alkyl, C₆–C₂₀-Aryl, (C₆–C₁₄)-Aryl-(C₁–C₈)-alkyl, 2-(CH₂)_c–[NH(CH₂)_c]_d–NR⁶R⁶ worin c eine ganze Zahl von 2 bis 6 und d eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, und R⁶ unabhängig voneinander Wasserstoff oder C₁–C₆-Alkyl oder C₁–C₄-Alkoxy-C₁–C₆-alkyl ist;

R⁴ C₁–C₁₈-Alkyl, C₆–C₂₀-Aryl oder (C₆–C₁₀)-Aryl-(C₁–C₈)-alkyl bedeutet oder im Falle von NR³R⁴ zusammen mit R³ und dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5–6gliedrigen heterozyklischen Ring bedeutet, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann,

p eine ganze Zahl von 1 bis 100 ist,

q eine ganze Zahl von 0 bis 22 ist,

R⁵ Wasserstoff oder eine funktionelle Gruppe wie beispielsweise Hydroxy, Amino, C₁–C₁₈-Alkylamino, COOH, CONH₂, COO(C₁–C₄)-Alkyl oder Halogen bedeutet;

Z und Z' unabhängig voneinander Hydroxy, Mercapto, SeH, C_1-C_{22} -Alkoxy, $O-(CH_2)_b-NR^6R^7$, worin b eine ganze Zahl von 1 bis 6 ist, und R^7 C_1-C_6 -Alkyl ist oder R^6 und R^7 zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 3-6gliedrigen Ring bilden, C_1-C_{18} -Alkyl, C_6-C_{20} -Aryl, (C_6-C_{14}) -Aryl- (C_1-C_6) -alkyl, (C_6-C_{14}) -Aryl- (C_1-C_6) -alkoxy, wobei Aryl auch Heteroaryl bedeutet und Aryl gegebenenfalls durch 1, 2 oder 3 gleiche oder verschiedene Reste aus der Reihe Carboxy, Amino, Nitro, C_1-C_4 -Alkylamino, C_1-C_6 -Alkoxy, Hydroxy, Halogen und Cyano substituiert ist, C_1-C_{18} -Alkylmercapto, NHR^3 , NR^3R^4 , einen Rest der Formel IV oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigt oder als Markierung einer DNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift, und die geschweifte Klammer andeutet, daß sich R^2 und der benachbarte Phosphoryl-Rest in 2'- und 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können, wobei jedes Nucleotid in seiner D- bzw. L-Konfiguration vorliegen kann und sich die Base B in α - bzw. β -Stellung befinden kann, mit der Maßgabe, daß Y, Y', X, V, und W nicht alle Oxo und U nicht Hydroxy bedeuten wenn $E = OH$ oder NH_2 und F = OH ist, R^{16} Wasserstoff ist und R^{15} Br, Cl, F, Cyano, (C_1-C_4) -Alkyl, (C_2-C_4) -Alkenyl oder (C_2-C_4) -Alkynyl bedeutet.

Unter in der Nukleotidchemie übliche Basen sind beispielsweise natürliche Basen wie Adenin, Cytosin, Thymin, Guanin, Uracil, Hypoxanthin oder unnatürliche Basen wie beispielsweise Purin, 8-Azapurin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, N^4N^4 -Ethanocytosin, N^6N^6 -Ethano-2,6-diaminopurin, Pseudoisocytosin, 5-Methylcytosin, 5-Fluoruracil, 5- (C_3-C_6) -Alkynyluracil, 5- (C_3-C_6) -Alkynylcytosin oder deren Prodrugformen zu verstehen.

Bevorzugt sind Oligonukleotide der Formel I, die mindestens eine an der 7-Position substituierte 7-Desazaguaninbase (E gleich NH_2 und F gleich OH) oder 7-Desazaadeninbase (E gleich H und F gleich NH_2) aufweisen. Besonders bevorzugt sind Oligonukleotide der Formel I, die mindestens eine an der 7-Position substituierte 7-Desazaadeninbase und gegebenenfalls zusätzlich eine oder mehrere an der 7-Position substituierte 7-Desazaguanin-Basen aufweisen.

Bevorzugt sind auch Oligonukleotide der Formel I, bei denen sich die Base am Zucker in β -Stellung befindet, die Nucleotide in der D-Konfiguration vorliegen, R^2 sich in 2'-Stellung befindet und a für Oxy steht.

Bevorzugt sind des weiteren Oligonukleotide der Formel I in denen R^{15} (C_1-C_{10}) -Alkyl, insbesondere (C_1-C_4) -Alkyl, (C_1-C_{10}) -Alkenyl, (C_1-C_{10}) -Alkynyl, insbesondere Ethinyl oder Hexinyl, wobei die Alkenyl- und Alkynylgruppen wie oben beschrieben substituiert sein können, oder Halogen, insbesondere Brom oder Chlor bedeutet. Diese Substituenten sind insbesondere für den Fall bevorzugt, daß die Oligonukleotide nur eine oder mehrere 7-modifizierte 7-Desazaadeninbasen aber keine andere 7-Desazapurinbasen enthalten. Weisen die Oligonukleotide der Formel I eine oder mehrere 7-Desazaguaninbasen auf, so sind solche Oligonukleotide bevorzugt, in denen die 7-Desazaguaninbase(n) an der 7-Position einen Substituenten mit $R^{15} = (C_5-C_{10})$ -Alkenyl, (C_5-C_{10}) -Alkynyl, insbesondere Hexinyl, wobei die (C_5-C_{10}) -Alkenyl und (C_5-C_{10}) -Alkynyl wie oben beschrieben substituiert sein können.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide weisen im Vergleich zu den natürlichen Oligonukleotiden bei der Anlagerung an komplementäre Nukleinsäuren (Targetnukleinsäuren) eine verbesserte Bindungsaffinität auf.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Oligonukleotide ist deren erhöhte Säure- und Nucleasestabilität in Vergleich zu Oligonukleotiden, die natürliche Purinbasen enthalten.

Für die therapeutische Nutzung dieser Oligonukleotide ist es vorteilhaft, wenn in diese zusätzliche Modifikationen, beispielsweise des Phosphatrückgrats, der Ribose-Einheit oder der Oligonukleotid-Enden eingeführt werden [J.S. Cohen, Topics in Molecular and Structural Biology 12 (1989) Macmillan Press, E. Uhlmann et al, supra].

Durch ansich bekannte Modifikationen des Zucker-Phosphat-Rückgrats werden die erfindungsgemäßen Oligonukleotide beispielsweise noch besser gegen den Angriff von Nukleasen geschützt, was vorteilhaft ist.

Bevorzugt sind daher auch Verbindungen der Formel I, worin V, Y, Y' und W die Bedeutung von Thioxo, Selenoxo, Oxy, Oxo, Sulfandiyl, Imino oder Methylen haben und U die Bedeutung von Hydroxy, Mercapto oder Methyl hat. Ganz besonders bevorzugt sind diese, falls R^2 zusätzlich Hydroxy oder Wasserstoff, insbesondere Wasserstoff bedeutet.

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen auch Verbindungen der Formel I dar, in denen R^1 und R^{1a} Wasserstoff bedeuten.

Ganz besonders bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, in denen R^1 und/oder R^{1a} Wasserstoff, R^2 Hydroxy oder Wasserstoff, U Hydroxy oder Mercapto und V, Y, Y' und W die Bedeutung von Thioxo, Oxy, Oxo oder Hydroxy haben.

Unter den in der Nukleotidchemie üblichen Schutzgruppen sind beispielsweise Amino-, Hydroxyl- oder andere Schutzgruppen zu verstehen, wie sie in [E. Sonveaux, 1986, Bioorganic Chemistry, 14, 274-325 oder S.L. Beaucage et al, 1992, Tetrahedron, 48, 2223-2311] beschrieben werden.

Alkyl, Alkenyl und Alkynyl können geradkettig oder verzweigt sein.

Unter Cycloalkyl werden auch Alkyl-substituierte Ringe verstanden.

(C_6-C_{20}) -Aryl ist beispielsweise Phenyl, Naphthyl oder Biphenyl, vorzugsweise Phenyl.

Unter Halogen ist Jod, Brom, Chlor oder Fluor zu verstehen.

Unter Heteroaryl werden insbesondere Reste verstanden, die sich von Phenyl oder Naphthyl ableiten, in welchen eine oder mehrere CH-Gruppen durch N ersetzt sind und/oder in welchen mindestens zwei benachbarte CH-Gruppen (unter Bildung eines fünfgliedrigen aromatischen Rings) durch S, NH oder O ersetzt sind. Des weiteren können auch ein oder beide Atome der Kondensationsstelle bicyclischer Reste (wie im Indoliziny) N-Atome sein.

Als Heteroaryl gelten insbesondere Furanyl, Thienyl, Pyrrolyl, Imidazolyl, Pyrazolyl, Triazolyl, Tetrazolyl,

Oxazolyl, Isoxazolyl, Thiazolyl, Isothiazolyl, Pyridyl, Pyrazinyl, Pyrimidinyl, Pyridazinyl, Indolyl, Indazolyl, Chinolyl, Isochinolyl, Phthalazinyl, Chinoxalanyl, Chinazolanyl, Cinnolyl.

Beispielhaft für Gruppen NR^3R^4 , in denen R^3 und R^4 zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-bis 6gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom enthält, seien der Morpholinyl- und der Imidazolidinyl-Rest genannt.

Unter physiologisch verträglichen Salzen von Verbindungen der Formel (I) versteht man sowohl anorganische als auch organische Salze, wie sie in Remington's Pharmaceutical Sciences (17. Auflage, Seite 1418 (1985)) beschrieben sind.

Aufgrund der physikalischen und chemischen Stabilität und der Löslichkeit sind für saure Gruppen unter anderem Natrium-, Kalium-, Calcium- und Ammoniumsalze bevorzugt.

Die Erfindung ist nicht auf α - und β -D- bzw. L-Ribofuranoside, α - und β -D- bzw. L-Desoxyribofuranoside und entsprechende carbocyclische Fünfringanaloga beschränkt, sondern gilt auch für Oligonucleotidanaloga, die aus anderen Zucker-Bausteinen aufgebaut sind, beispielsweise Xylo- und Arabinofuranose Derivate, ringverweiterte und ringverengte Zucker, acyclische, ringverbrückte oder geeignete andersartige Zucker-Derivate. Die Erfindung ist ferner nicht auf die in Formel I beispielhaft aufgeführten Derivate des Phosphat-Restes beschränkt, sondern bezieht sich auch auf die bekannten Dephospho-Derivate.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können also in vielfältiger Weise von der natürlichen Struktur abgewandelt sein. Solche Modifikationen, die nach an sich bekannten Methoden eingeführt werden, sind beispielsweise:

a) Modifikationen der Phosphatbrücke

Beispielhaft seien genannt: Phosphorothioate, Phosphorodithioate, Methylphosphonate, Phosphoramidate, Boranophosphate, Phosphatmethylester, Phosphatethylester, Phenylphosphonate. Bevorzugte Modifikationen der Phosphatbrücke sind Phosphorothioate, Phosphorodithioate und Methylphosphonate.

b) Ersatz der Phosphatbrücke

Beispielhaft seien genannt: Ersatz durch Acetamid, Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylendimethylhydrazo, Dimethylensulfon, Silylgruppen. Bevorzugt ist der Ersatz durch Acetamid, Formacetale und 3'-Thioformacetale.

c) Modifikationen des Zuckers

Beispielhaft seien genannt: α -anomere Zucker, 2'-O-Methylribose, 2'-O-Butylribose, 2'-O-Allylribose, 2'-Fluoro-2'-desoxyribose, 2'-Amino-2'-desoxyribose, α -Arabinofuranose, Carbocyclische Zuckernanaloga. Bevorzugte Modifikation ist die durch 2'-O-Methylribose und 2'-O-n-Butylribose. Ganz besonders bevorzugt sind solche Modifikationen, bei denen die 2'- und 3'-Kohlenstoffatome der O-Ribose über eine Doppelbindung verknüpft sind und jeweils ein Wasserstoffatom als Substituenten tragen.

d) Modifikationen des Zuckers und der Phosphat-Brücke

Beispielhaft seien genannt die Peptid-Nukleinsäuren (PNA's), bei denen das Zucker/Phosphat-Rückgrat durch ein Aminoethylglycin-Rückgrat ersetzt ist, (s. Deutsche Patentanmeldung P 44 08 531.1) sowie die carbamatverbrückten Morpholino-Oligomeren. Die PNA's können auch mit Nukleinsäuren verknüpft sein, wie in der Deutschen Patentanmeldung P 44 08 528.1 beschrieben.

e) Andere Modifikationen der Basen, insbesondere der Pyrimidinbasen

Beispielhaft seien genannt: 5-Propinyl-2'-desoxyuridin, 5-Propinyl-2'-desoxycytidin, 5-Hexinyl-2'-desoxyuridin, 5-Hexinyl-2'-desoxycytidin, 5-Fluoro-2'-desoxycytidin, 5-Fluor-2'-desoxyuridin, 5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin, 5-Methyl-2'-desoxycytidin, 5-Brom-2'-desoxycytidin. Bevorzugte Modifikationen sind 5-Propinyl-2'-desoxyuridin, 5-Hexinyl-2'-desoxyuridin, 5-Hexinyl-2'-desoxycytidin und 5-Propinyl-2'-desoxycytidin.

f) 3'-3'- und 5'-5'-Inversionen [z. B. M. Koga et al., J. Org. Chem. 56 (1991) 3757].

g) 5'- und 3'-Konjugate.

Beispielhaft für Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, sind verschiedene lipophile Reste wie $-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}_3$, worin x eine ganze Zahl von 6 bis 18 bedeutet, $\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$, worin n und m unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 6 bis 12 bedeuten, $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}_3$, $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8-(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}_3$ und $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_7-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$, aber auch Steroid-Reste wie Cholesteryl oder Vitamin-Reste wie Vitamin E, Vitamin A oder Vitamin D und andere Konjugate, die natürliche Carriersysteme ausnutzen wie Gallensäure, Folsäure, 2-(N-Alkyl, N-Alkoxy)-Aminoanthrachinon und Konjugate der Mannose und Peptide der entsprechenden Rezeptoren, die zur rezeptorvermittelten Endozytose der Oligonucleotide führen wie EGF (Epidermal Growth Factor), Bradykinin und PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Unter Markierungs-Gruppen sind fluoreszierende Gruppen beispielsweise von Dansyl (= N-Dimethyl-1-aminonaphthyl-5-sulfonyl-), Fluorescein- oder Coumarin-Derivaten oder chemilumineszierende Gruppen beispielsweise von Acridin-Derivaten zu verstehen sowie das über ELISA nachweisbare Digoxigenin-System, die über das Biotin/Avidin-System nachweisbare Biotin-Gruppe oder aber Linker-Arme mit funktionellen Gruppen, die eine nachträgliche Derivatisierung mit nachweisbaren Reporter-Gruppen gestatten, beispielsweise ein Aminoalkyl-Linker, der mit einem Acridinium-Aktivester zur Chemilumineszenz-Probe umgesetzt wird. Dem Fachmann sind weitere geeignete Linker aus den veröffentlichten Patentanmeldungen EP 251 786 und WO 93/09217 bekannt.

h) Konjugation über 7- und/oder 8-Position am 7-Desazapurin

Über die 7- und/oder 8-Position des 7-Desazapurins können ebenfalls Gruppen konjugiert sein, die als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder die intrazelluläre Aufnahme begünstigen. 7-Desazapurinnucleoside, an die über die 7-Stellung des 7-Desazapurins Biotin- bzw. Iminobiotinrest über einen

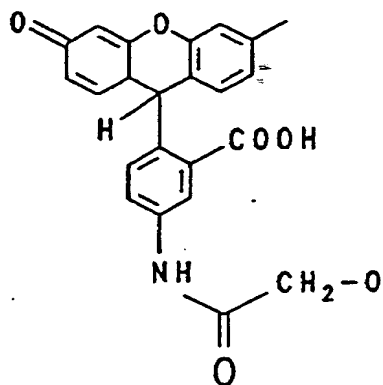
spezielle Verbindungsgruppe konjugiert sind, sind aus EP 63 879 bekannt.

Unter Markierungs-Gruppen für eine DNA- oder RNA-Sonde sind fluoreszierende Gruppen beispielsweise von Dansyl- (= N-Dimethyl-1-aminonaphthyl-5-sulfonyl-), Fluorescein- oder Coumarin-Derivaten oder chemi-
lumineszierende Gruppen beispielsweise von Acridin-Derivaten zu verstehen sowie das über ELISA nachweis-
bare Digoxigenin-System oder die über das Biotin/Avidin-System nachweisbare Biotin-Gruppe sowie die unter
g) bereits aufgeführte Interkalatoren und chemisch aktive Gruppen (siehe auch Beaucage et al, Tetrah. (1993)
Vol 49, No. 10, 1925—1963).

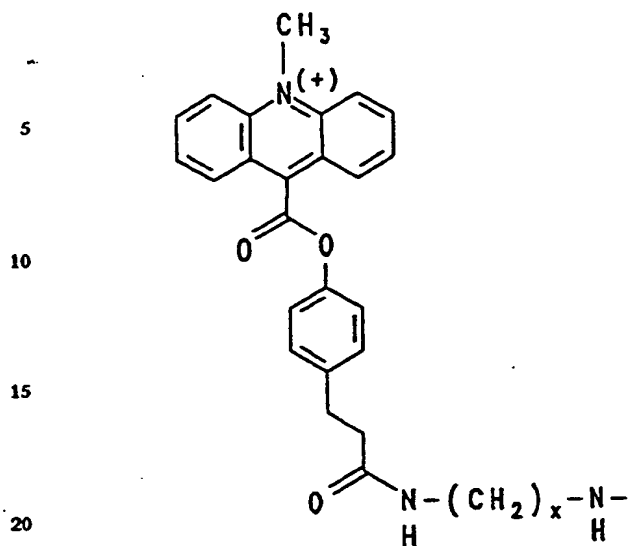
Beispielhaft für Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, sind Steroid-Reste wie Cholesteryl
oder Vitamin-Reste wie Vitamin E, Vitamin A oder Vitamin D und andere Konjugate, die natürliche Carriersy-
steme ausnutzen wie Gallensäure, Folsäure, 2-(N-Alkyl, N-Alkoxy)-Aminoanthrachinon und Konjugate der
Mannose und Peptide der entsprechenden Rezeptoren, die zur rezeptorvermittelten Endozytose der Oligonu-
cleotide führen wie EGF (Epidermal Growth Factor), Bradykinin und PDGF (Platelet Derived Growth Factor).

Allgemein können die beschriebenen Gruppen sowohl auf der Ebene der Oligonukleotide (beispielsweise
über SH-Gruppen) als auch auf der Ebene der Monomeren (Phosphonate, Phosphoamidite oder Triphosphate)
eingeführt werden. Bei den Monomeren, insbesondere bei den Triphosphaten, ist es vorteilhaft, die Seitenketten,
an die eine Reporter- oder Interkalatorgruppe eingeführt werden soll, geschützt zu lassen, und erst nach der
Phosphorylierung die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten und mit einem gegebenenfalls aktivierten Deri-
vat der entsprechenden Reporter- oder Interkalatorgruppe umzusetzen.

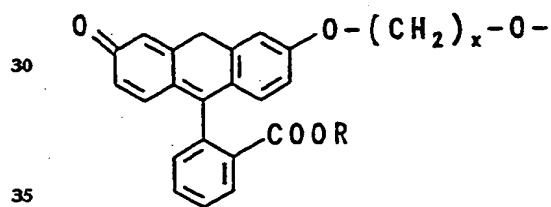
Typische Markierungsgruppen sind:



Fluorescein-Derivat

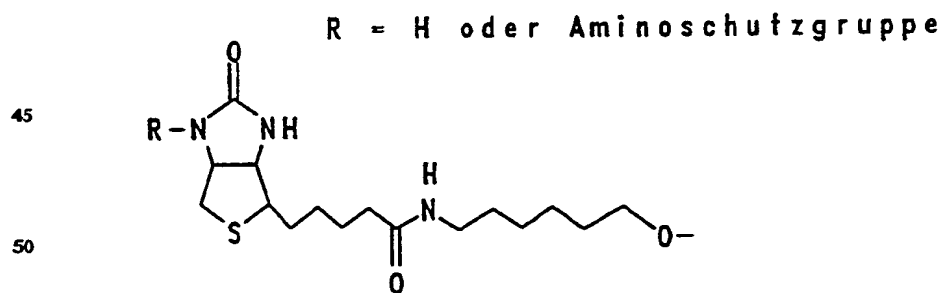


Acridinium-Ester

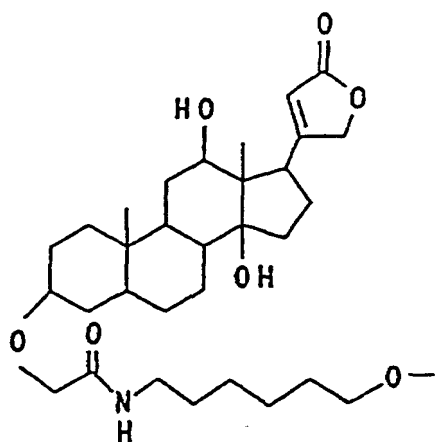


$x = 2-18$ bevorzugt 4
 $R = H$ oder C_1-C_4 -Alkyl
 (= "Fluorescein" fuer $x = 4$ und $R = CH_3$)

Fluorescein-Derivat

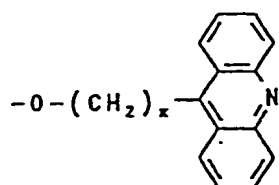


Biotinkonjugat (= "Biotin" fuer $R = Fmoc$)

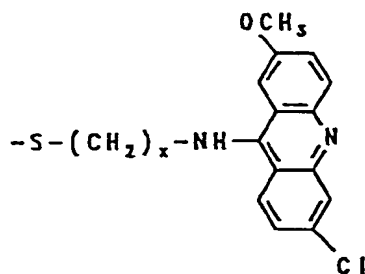


Digoxigeninkonjugat

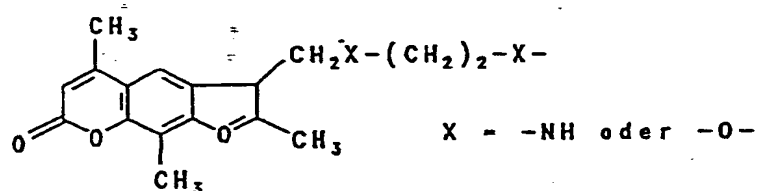
Oligonucleotidanaloga, die an Nucleinsäuren binden bzw. interkalieren und/oder spalten oder quervernetzen, enthalten z. B. Acridin-, Psoralen-, Phenanthridin, Naphtochinon-, Daunomycin- oder Chlorethylaminoaryl-Konjugate. Typische interkalierende und quervernetzende Reste sind:



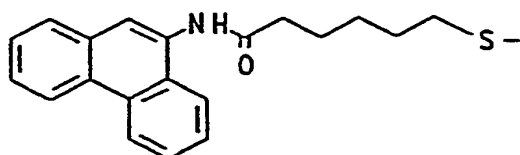
Acridinderivat $x = 2-12$, bevorzugt 4



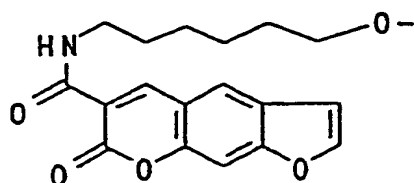
$x = 2-12$, bevorzugt 4



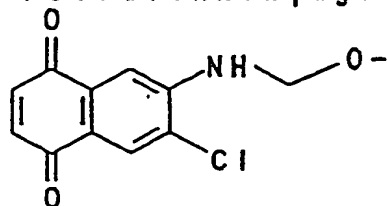
Trimethylpsoralen-konjugat (= "Psoralen" fuer $X = O$)



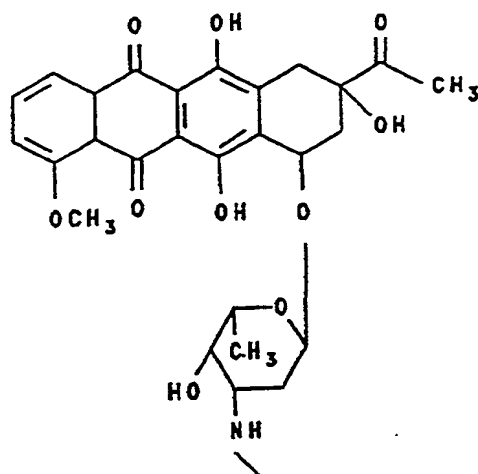
Phenanthrolinkonjugat



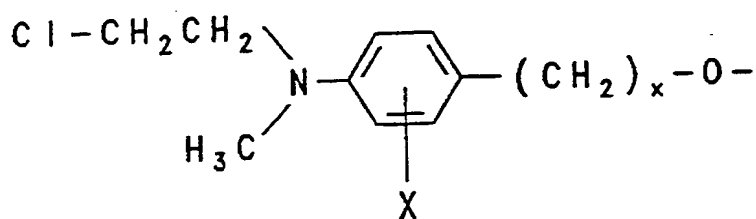
Psoralenkonjugat



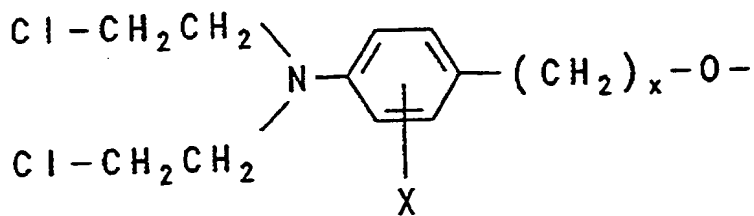
Naphthochinonkonjugat



Daunomycinderivat

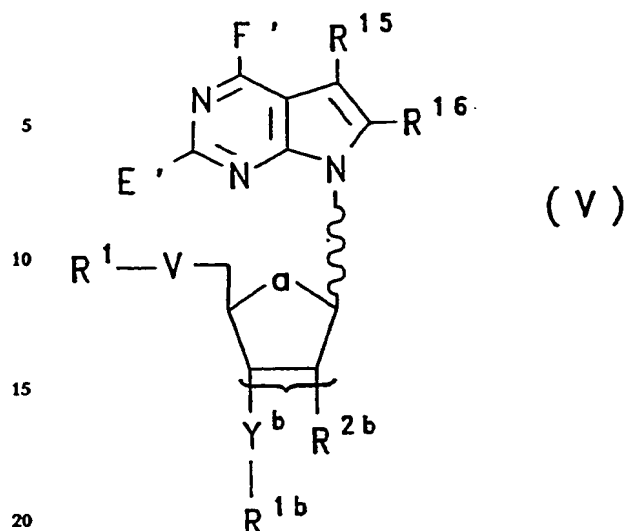


$x = 1-18$, $X = \text{Alkyl, Halogen, NO}_2, \text{CN, } \begin{array}{c} \text{---C---R} \\ || \\ \text{O} \end{array}$



$x = 1-18$, $X = \text{Alkyl, Halogen, NO}_2, \text{CN, } \begin{array}{c} \text{---C---R} \\ || \\ \text{O} \end{array}$

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verbindung der Formel V



worin

V Oxy, Sulfandiyl oder Imino ist;

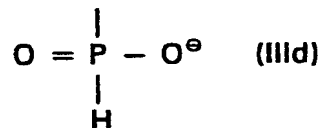
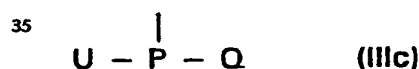
25 Y^b Oxy, Sulfandiyl, Imino oder Methylen ist;

a für Oxy, Sulfandiyl oder Methylen steht;

R^{2b} Wasserstoff, OR¹², C₁–C₁₈-Alkoxy, C₁–C₆-Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, Halogen, Azido oder NR¹⁰R¹¹ bedeutet;

R¹ eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe bedeutet;

30 R^{1b} ein Succinylrest ist, der über eine Amid- oder Methylimidbindung mit einem amino- oder methylaminofunktionalisierten Träger verknüpft ist, oder einen Rest der Formel IIIc oder IIIId bedeutet



40

worin

U (C₁–C₁₈)-Alkoxy, (C₁–C₁₈)-Alkyl, (C₆–C₂₀)-Aryl, (C₆–C₁₄)-Aryl-(C₁–C₆)-Alkyl, O–R⁷, S–R⁷ oder einen Rest der Formel IV

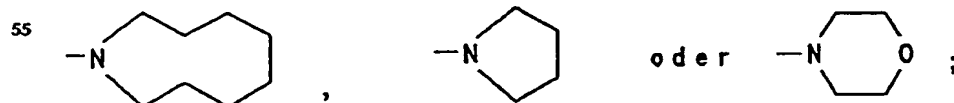


worin R⁵ gleich H ist, bedeutet;

Q einen Rest –NR⁸R⁹ bedeutet

R⁷ –(CH₂)₂–CN bedeutet;

50 R⁸ und R⁹ gleich oder verschieden sind und C₁–C₆-Alkyl, insbesondere Isopropyl oder Ethyl bedeuten oder zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5–9gliedrigen heterozyklischen Ring bedeuten, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann, insbesondere



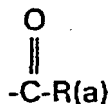
60 E' und F' unabhängig voneinander H, OR¹², NR¹⁰R¹¹ bedeuten,

R¹⁰ und R¹¹ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine in der Nukleotidchemie übliche Aminoschutzgruppe bedeuten oder R¹⁰ und R¹¹ gemeinsam eine in der Nukleotidchemie übliche Aminoschutzgruppe bilden,

65 R¹² Wasserstoff oder eine in der Nukleotidchemie übliche Hydroxylschutzgruppe, wie beispielsweise t-Butyldimethyl-silyl, Dimethoxytriphenylmethyl (DMT), Triisopropyl-silyl, o-nitro-Benzyl, p-nitro-Benzyl, iBu, 2-Fluorphenyl-4-methoxypiperidin-4-yl (FPMP), oder Methyl bedeutet,

R¹⁵ und R¹⁶ unabhängig voneinander

1. Wasserstoff
2. Halogen,
3. (C₁—C₁₀)-Alkyl,
4. (C₂—C₁₀)-Alkenyl,
5. (C₂—C₁₀)-Alkynyl,
6. NO₂
7. NH₂,
8. Cyano,
9. —S—(C₁—C₆)-Alkyl,
10. (C₁—C₆)-Alkoxy
11. (C₆—C₂₀)-Aryloxy
12. SiH₃
- 13.



14. einen wie unter 3., 4., oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, S—(C₁—C₆)-Alkyl, (C₁—C₆)-Alkoxy, OH, —NR(c)R(d), —CO—R(b), —NH—CO—NR(c)R(d), —NR(c)R(g), —NR(e)R(f), —NR(e)R(g) oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel —[O—(CH₂)_r—NR(c)R(d), wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1—18, bevorzugt 1—6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, —CO—R(b), —NH—CO—NR(c)R(d), —NR(c)R(d), —NR(e)R(f), —NR(e)R(g) oder —NR(c)R(g) eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe tragen oder mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder
15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet.

R(a) OH, (C₁—C₆)-Alkoxy, (C₆—C₂₀)-Aryloxy, NH₂ oder NH—T bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sind, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,

R(b) Hydroxyl, (C₁—C₆)-Alkoxy, oder —N(R(c)R(d) bedeutet,

R(c) und R(d) unabhängig voneinander H, (C₁—C₆)-Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit —NR(e)R(f) oder —NR(e)R(g) bedeuten,

R(e) und R(f) unabhängig voneinander H oder (C₁—C₆)-Alkyl bedeuten,

R(g) (C₁—C₆)-Alkyl-COOH bedeutet mit der Maßgabe, daß R¹⁵ und R¹⁸ nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO₂, NH₂, Cyano oder SiH₃ sein können,

wobei funktionelle Gruppen wie OH, NH₂ oder COOH gegebenenfalls mit einer in der Nukleotidchemie üblichen Schutzgruppe geschützt sind, die geschweifte Klammer andeutet, daß sich R² und der benachbarte Phosphorylrest in 2'- und 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-(CH₂)₂-CN bedeutet und R⁸ und R⁹ gleich oder verschieden sind und Isopropyl oder Ethyl bedeuten, oder zusammen mit dem sie tragenden N-Atom einen aliphatischen Heterocyclus, bevorzugt Pyrrolidino, bilden. Ganz besonders bevorzugt sind diese, falls sich zusätzlich die Base am Zucker in β-Stellung und R^{2b} in 2'-Stellung befindet.

Bevorzugt sind auch Verbindungen der Formel (V), in denen E gleich NR¹⁰R¹¹ und F gleich H ist und ganz allgemein solche Verbindungen der Formel (V), die für die Herstellung bevorzugte Oligonukleotide der Formel I eingesetzt werden können.

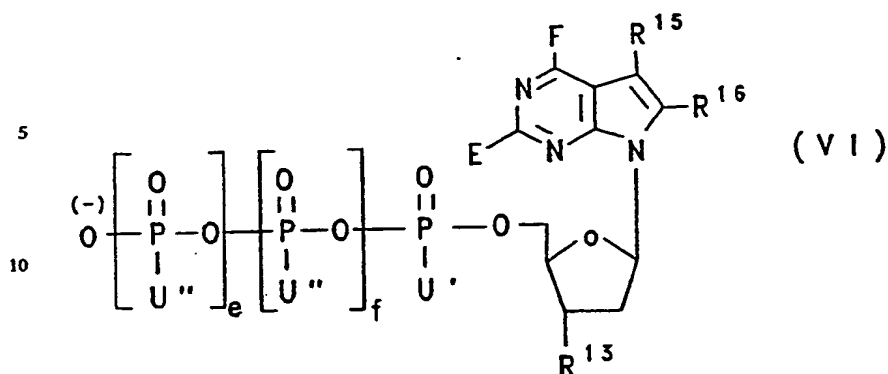
Bevorzugte Aminoschutzgruppen sind beispielsweise Acyl- oder Amidin-Schutzgruppen.

Unter dem üblicherweise als Salz vorliegenden Rest der Formel (III d) sind anorganische oder organische Salze, beispielsweise Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalze, die z. B. in Remington's Pharmaceutical Sciences (17. Auflage, Seite 1418 (1985) beschrieben sind, zu verstehen. Beispielhaft seien Triethylammonium- und Pyridiniumsalze genannt.

Die Erfindung umfaßt aber auch Verbindungen der allgemeinen Formel (V), in denen der Rest der Formel (III d) als freie Säure vorliegt.

Die Verbindungen der Formel V können als Baustein für die Herstellung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide der Formel I eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft auch Verbindungen der Formel VI

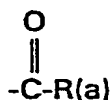


20 worin unabhängig voneinander

$U' = U'' = U'''$ gleich Hydroxyl oder Mercapto ist und U' zusätzlich BH_3 sein kann,
e und f 0 oder 1 bedeuten;

R^{13} Wasserstoff, OH, C_1-C_{18} -Alkoxy, C_1-C_6 -Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, bedeutet;
E und F unabhängig voneinander H, OH oder NH_2 bedeuten; und
 R^{15} und R^{16} unabhängig voneinander

- 25
- 30
- 35
1. Wasserstoff
 2. Halogen,
 3. (C_1-C_{10}) -Alkyl,
 4. (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
 5. (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
 6. NO_2 ,
 7. NH_2 ,
 8. Cyano,
 9. $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl,
 10. (C_1-C_6) -Alkoxy
 11. (C_6-C_{20}) -Aryloxy
 12. SiH_3
 - 13.



- 45
- 50
- 55
14. einen wie unter 3., 4., oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, $S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, (C_1-C_6) -Alkoxy, OH, $-NR(c)R(d)$, $-CO-R(b)$, $-NH-CO-NR(c)R(d)$, $-NR(c)R(g)$, $-NR(e)R(f)$, $-NR(e)R(g)$ oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel $-[O-(CH_2)_r]_s-NR(c)R(d)$, wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, $-CO-R(b)$, $-NH-CO-NR(c)R(d)$, $-NR(c)R(d)$, $-NR(e)R(f)$, $-NR(e)R(g)$ oder $-NR(c)R(g)$ zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder
 15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet.

60

65

R(a) OH, (C_1-C_6) -Alkoxy, (C_6-C_{20}) -Aryloxy, NH_2 oder $NH-T$ bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sind, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,
R(b) Hydroxyl, (C_1-C_6) -Alkoxy, oder $-N(R(c)R(d))$ bedeutet,
R(c) und R(d) unabhängig voneinander H, (C_1-C_6) -Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit $-NR(e)R(f)$ oder $-NR(e)R(g)$ bedeuten,
R(e) und R(f) unabhängig voneinander H oder (C_1-C_6) -Alkyl bedeuten,
R(g) (C_1-C_6) -Alkyl-COOH bedeutet mit der Maßgabe, daß R^{15} und R^{16} nicht j weils gleichzeitig Wasserstoff, NO_2 , NH_2 , Cyano oder SiH_3 sein können,

wobei Verbindungen der Formel VI ausgenommen sind in denen R^{16} gleich H ist und R^{15} (C_2-C_{10})-Alkynyl, substituiert mit $-NR(c)R(d)$ oder $-NR(e)R(f)$ bedeutet; und der weiteren Maßgabe, daß e und f nicht 0 sind, wenn E = OH oder NH_2 und F = OH ist, R^{16} Wasserstoff ist und R^{15} Br, Cl, F, Cyano, (C_1-C_4)-Alkyl, (C_2-C_4)-Alkenyl oder (C_2-C_4)-Alkynyl bedeutet.

Die Erfindung umfaßt auch Verbindungen der allgemeinen Formel VI, die in allgemein üblicher Weise mit einer radioaktiver Markierung versehen sind (z. B. α P-Atom ist gleich ^{32}P ; U' ist gleich ^{35}S).

Bevorzugt sind Verbindungen der Formel VI in denen U' Hydroxyl oder Mercapto bedeutet, $U'' = U'''$ Hydroxyl bedeutet und e und/oder f gleich 1 ist. Besonders bevorzugt sind die Verbindungen der Formel VI, wenn e und f gleich 1 ist.

Die üblicherweise als Salz vorliegende Verbindungen der Formel VI umfassen anorganische oder organische Salze, beispielsweise Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalze [Remington's Pharmaceutical Sciences (17. Auflage, Seite 1418 (1985)). Beispielhaft seien Triethylammonium und Pyridiniumsalze genannt.

Die erfindungsgemäßen Verbindung VI umfassen auch solche Verbindungen, in denen die Phosphatgruppe als freie Säure vorliegt.

Aus EP 251 786 sind 7-Desazapurin-Nukleotide, bzw. deren Mono-, Di- oder Triphosphate bekannt, die eine Alkylaminogruppe an der 7-Purin Position aufweisen. Die Alkylaminogruppe dient als "Linker", über den fluoreszierende Markermoleküle an das Nukleotid angekoppelt werden können. Die mit einem Fluoreszenzmarker versehenen Didesoxynukleotide können dann als Kettenabbruchmoleküle ("chain terminatoren") für die Didesoxysequenzierung nach Sanger verwendet und direkt fluoreszenzspektroskopisch detektiert werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel VI können allgemein als Hilfsmittel in der Molekularbiologie eingesetzt werden, beispielsweise in PCR-Reaktionen ($e = f = 1$, $R^{13} = OH$) oder zum Sequenzieren ($e = f = 1$; $R^{13} = H$ oder OH).

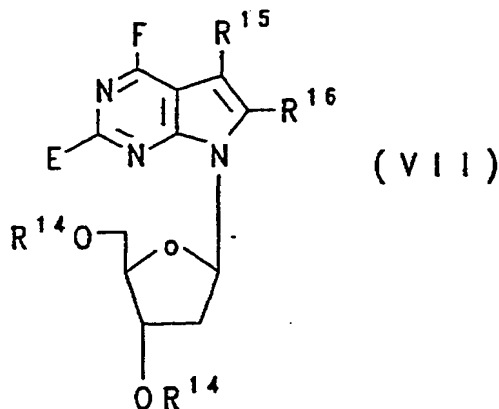
Die Verwendung von substituierten 7-Desazapurinnukleotiden für die Sequenzierung ist aus mehreren Gründen vorteilhaft. So wird bei der Sequenzierungsmethode nach Sanger (Didesoxytechnik) die für GC-reiche Nukleotidbereiche oft zu beobachtende Kompression der Banden, die eine korrekte Bestimmung der Nukleotidsequenz erschwert, eliminiert oder zumindest verringert. Zusätzlich werden die während der Sequenzierung durch DNA- bzw. RNA-Polymerasen synthetisierten doppelsträngigen Nucleinsäuren durch den Einbau 7-substituierter 7-Desazapurinbasen stabilisiert.

Die Verwendung substituierten 7-Desazapurinnukleotide ist somit gegenüber der Verwendung von unsubstituierten 7-Desazaguanosinnukleotiden, die üblicherweise bei der Nukleinsäuresequenzierung zur Eliminierung von Bandenkompressionen GC-reicher DNA-Abschnitte eingesetzt werden (EP 212536), von Vorteil. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung substituierten 7-Desazapurinnukleotiden bei der Sequenzierung ist, daß sich an den Substituenten in einer Reihe von Folgereaktionen fluoreszierende Reste in Form von Reportergruppen einführen lassen, die die fluoreszenzspektroskopische Detektion der während der Sequenzierungsreaktion synthetisierten Nucleinsäuremoleküle ermöglicht.

Des weiteren ermöglicht der Einbau von eigenfluoreszierenden, substituierten 7-Desazapurinbasen in Oligonukleotide, diese direkt über die Eigenfluoreszenz der substituierten 7-Desazapurinbasen nachzuweisen. So werden z. B. die in unsubstituierter Form nicht fluoreszierenden 7-Desazapurinbasen fluoreszierend, wenn an die 7-Position eine Alkylgruppe, z. B. Hexinyl eingeführt wird. Die Eigenfluoreszenz dieser Verbindungen läßt sich nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm (Exitation) bei 350 nm (Emission) messen.

Die Darstellung der Verbindungen der Formel VI ist ausgehend von den entsprechenden substituierten 7-Desazapurin-Nucleosiden möglich und erfolgt nach allgemein bekannten Methoden. Bevorzugt können die Verbindungen der Formel VI nach einem verkürzten Eintopfverfahren von Ludwig in Gegenwart von 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin und Trimethylphosphat hergestellt werden [J. Ludwig et al, (1981) Acta Biochem. Biophys. Sci. Hung., 16, 131].

Die Erfindung betrifft auch Verbindungen der allgemeinen Formel VII



worin

E und F unabhängig voneinander H, OH oder NH_2 bedeuten und OH und

NH_2 gegebenenfalls mit einer in der Nukleotidchemie üblichen Schutzgruppe geschützt sind;

R^{15} und R^{16} unabhängig voneinander Wasserstoff, (C_5-C_{10})-Alkyl, (C_5-C_{10})-Alkenyl, (C_5-C_{10})-Alkynyl, J, Cl,

Br, F oder Cyano bedeuten, wobei R^{15} und R^{16} nicht gleichzeitig Wasserstoff sein können wobei R^{15} nicht Wasserstoff, Cl, Br oder Cyano sein kann wenn R^{16} und E Wasserstoff und F NH_2 bedeuten, und der weiteren Maßgabe, daß R^{15} nicht J ist, wenn R^{16} Wasserstoff, E NH_2 und F OH bedeutet, R^{14} unabhängig voneinander H oder eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe bedeutet.

Die Erfindung umfaßt auch alle tautomeren Formen der Verbindungen der Formel I, V und VI, VII, insbesondere alle tautomeren Formen der 7-Desazapurinbasen der Formel III.

Ganz allgemein sind auch solche Verbindungen der Formel V, VI und VII bevorzugt, die als Ausgangs- bzw. Zwischenverbindungen für die Herstellung bevorzugter Oligonukleotide der Formel I verwendet werden können.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide der Formel I.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen, substituierte 7-Desazapurine enthaltende Oligonukleotide können die in der chemischen Synthese von Oligonucleotiden üblichen Standardbedingungen angewandt werden.

Die Darstellung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide der Formel I erfolgt in Lösung oder vorzugsweise an fester Phase, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines automatischen Synthesegeräts. Der Aufbau der Oligomere der Formel I kann schrittweise erfolgen, indem sukzessive eine Mononucleotid mit jeweils einer Nucleobase an einen entsprechend derivatisierten Träger oder an eine wachsende Oligomerkette ancondensiert werden.

Alternativ kann der Aufbau der Oligonukleotide der Formel I durch Zusammenfügen von Di- oder auch Trinukleotiden erfolgen [S. Beaucage et al, Tetrah. Vol. 48, No. 12, 2223—2311, (1992); und Tetrah. Vol. 48, No. 28, 6123—6194, (1993)]. Dies ist besonders bei der Synthese von Oligonukleotiden, die modifizierte Phosphatbrücken aufweisen, von Vorteil.

Der Aufbau des Oligonucleotids erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Verfahren wie der Triester-Methode, der H-Phosphonat-Methode oder Phosphoramidit-Methode, [E. Sonveaux, (1986), Bioorganic Chemistry, 14, 274—325; S.L. Beaucage et al, (1992), Tetrathedron, 48, 2223—2311]. Zur Einführung der 7-Desazapurinderivate werden bevorzugt die Nukleotid-Monomerbausteine der Formel V, insbesondere bevorzugt die der Formel V in der E' gleich $NR^{10}R^{11}$ und F' gleich OR^{12} ist oder F' gleich $NR^{10}NR^{11}$ ist und E' gleich H ist, eingesetzt.

Die Bereitstellung der Verbindungen der Formel V als Bausteine für die Oligonucleotid-Festphasensynthese kann ausgehend von den entsprechenden 7-Desazapurin-Nucleosiden erfolgen. Die Einführung von Substituenten an die 7-Position des 7-Desazapurinringsystems ist nach allgemein bekannten Methoden möglich. Die Herstellung von an der 7-Position mit Halogen oder Methyl substituierten 7-Desazapurinnucleoside wird beispielsweise von Seela et al [Helvetica Chimica Acta, (1994) 77, 897—903] beschrieben. Alkenyl- bzw. Alkynyl-substituierte 7-Desazapurinderivate der Formel V lassen sich ausgehend von dem bekannten 5-Jodtubercidin (= 7-J-7-Desazaadenosin, siehe Seela et al, supra) herstellen, indem mittels einer Kreuzkupplungsreaktion in Gegenwart von Tetrakis(triphenyl-phosphin)-palladium (O) Alkenyl- oder Alkynylgruppen an die 7-Position des 7-Desazapurinringssystems gekoppelt werden. Elektrophile Substituenten (z. B. Halogene) können in die 8-Position des 7-Desazapurinringssystems eingeführt werden, wenn als Ausgangsverbindungen Nucleoside eingesetzt werden, die einen elektronenliefernden Substituenten (beispielsweise eine Aminogruppe) an der 2-Position des 7-Desazapurins aufweisen. Ist die 2-Aminogruppe beispielsweise acetyliert, so wird der elektrophile Substituent in die 7-Position dirigiert. Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur regioselektiven Einführung von elektrophilen Substituenten (beispielsweise Halogenen) in die 7- oder 8-Position von 7-Desazapurinnucleosiden. Die halogenierten Nucleoside können dann als Ausgangsverbindung für die Einführung anderer Substituenten, beispielsweise von Alkyl, Alkenyl- oder Alkynylgruppen über die oben beschriebene palladium-katalysierte Kreuzkupplungsreaktion, dienen. Alkoxy- oder substituierte Aminderivate können durch nukleophile Substitution, Nitrogruppen durch elektrophile Substitution eingeführt werden.

Im Falle von 7,8 bis-alkynylierten 7-Desazapurinen läßt sich durch Bergman-Reaktionen und auch photochemisch ein Diradikal erzeugen, bzw. ein weiteres Ringsystem annellieren [N. Turro et al, mTetrahydron Letters, 1994, Vol. 35, 8089].

Nach Einführung geeigneter Schutzgruppen für die Aminogruppen der 7-Desazapurinbasen sowie der freien 5'-Hydroxylgruppe des Zuckers werden die Monomere in die entsprechenden Phosphonat- bzw. Phosphoramidit-Derivate übergeführt. Die Einführung geeigneter Aminoschutzgruppen, z. B. in Form einer Formamidin-Schutzgruppe ((Dimethyl-amino)methyliden) oder Acylschutzgruppen (z. B. Benzoyl oder Phenoxyacetyl) erfolgt nach allgemein bekannten Methoden [L.J. Mc Bride et al, (1983) Tetrahedron Lett., 24, 2953; G.S. Ti et al, (1982) J. Am. Chem. Soc., 104, 1316; H. Schaller et al (1963), J. Am. Chem. Soc., 85, 3821], wobei im Falle der Acylierung der Aminogruppe die Anwendung der Peracylierungsmethode nach Schaller vorteilhaft ist. Eine geeignete Schutzgruppe für die freie 5'-OH-Gruppe des Zuckers ist z. B. 4,4'-Dimethoxytrityl, deren Einführung ebenfalls nach bekannten Methoden erfolgt [C.B. Reese (1978), Tetrahedron, 34, 3143; D. Flockerzi et al, (1981), Liebigs Ann. Chem., 1568]. Die solchermaßen geschützten Monomere können entsprechend einer Vorschrift von Froehler et al zu den entsprechenden Phosphonaten umgesetzt werden [B. C. Froehler et al, (1986), Nucl. Acid Res., 14, 5399]. Die Herstellung von Cyanoethyl-Phosphoramidit-Derivaten kann beispielsweise durch Umsetzung der Monomere mit Chlor- β -cyanoethoxy-(N,N-diisopropylamino)phosphan in wasserfreien Dichlormethan erfolgen [N. D. Sinha et al, (1984) Nucl. Acid Res., 12, 4539].

Die Synthese von Verbindungen der Formel I, deren Oligonucleotid-Teil am 3'-und/oder am 5'-Ende modifiziert sind, erfolgt bezüglich dieser Modifikationen nach den in EP-A 0 552 766 beschriebenen Verfahren.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide der Formel I zur Herstellung eines Arzneimittels sowie ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die erfindungsgemäßen Oligonucleotide mit einem physiologisch annehmbaren Träger sowie gegebenenfalls geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen vermischt.

Ganz generell erstreckt sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von Oligonukleotiden der Formel

I als therapeutisch wirksame Bestandteile eines Arzneimittels. Als therapeutisch wirksame Oligonucleotid-Derivate versteht man im allgemeinen Antisense Oligonucleotide, Tripelhelix-bildende-Oligonucleotide, Aptamere oder Ribozyme, insbesondere Antisense-Oligonucleotide.

Darüberhinaus ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung von Oligonukleotiden mit mindestens einem substituierten 7-Desazapurin, vorzugsweise 7-Desazaadenin oder 7-Desazaguanin, als Diagnostikum, beispielsweise zur Detektion der An- oder Abwesenheit oder der Menge eines spezifischen doppelsträngigen oder einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls in einer biologischen Probe.

Die Oligonukleotide haben für die erfindungsgemäße Verwendung eine Länge von 4 bis 100, vorzugsweise von ca. 5—40, insbesondere von ca. 6—30 Nucleotiden. Ansonsten gelten auch hier die oben beschriebenen Vorzugsbereiche, Modifikationen bzw. Konjugationen.

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Viren, verwendet werden.

Erfindungsgemäße Antisense Oligonucleotide-Derivate, also Antisense Oligonucleotide, in denen mindestens eine Purinbase durch eine substituierte 7-Desazapurinbase ersetzt ist, und die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basensequenz:

a) gegen HIV, z. B.

5'-ACACCCAATTCTGAAAATGG-3' (I)

oder

5'-AGGTCCCTGTTCTGGGCGCCA-3' (II)

oder

5'-GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA-3' (III)

oder

5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAA-3' (IV)

oder

5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCA (VI)

oder

b) gegen HSV-1, z. B.

5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCG-3' (VII)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs. Beispielsweise können dabei Oligonucleotid-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Krebsentstehung bzw. Krebswachstum verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

- 1) Nucleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120
- 2) Cytoplasmische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJ-ras c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl
- 3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EGF-Rezeptor, c-erbA, Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms
- 4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, bFGF, Myeloblastin, Fibronectin.

Erfindungsgemäße Antisense-Oligonucleotide der Formel I, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) gegen c-Ha-ras, z. B.

5'-CAGCTGCAACCCAGC-3' (VIII)

c) c-myc, z. B.

5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3' (IX)

5'-AACGTTGAGGGGCGAT-3' (X)

d) c-myb, z. B.

5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3' (XI)

5 e) c-fos, z. B.

5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3' (XII)

5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAAG-3' (XIII)

10 5'-GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3' (XIV)

f) p120, z. B.

15 5'-CACCCGCCTTGGCCTCCCAC-3' (XV)

g) EGF-Rezeptor, z. B.

5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3' (XVI)

20 5'-GGCAAACCTTTCTTTTCCTCC-3' (XVII)

h) p53 Tumorsuppressor, z. B.

25 5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3' (XVIII)

5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3' (XIX)

30 Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM oder ELAM.

Erfindungsgemäße Antisense-Oligonucleotid-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

35 a) VLA-4, z. B.

5'-GCAGTAAGCATCCATATC-3' (XX)

oder

40 b) ICAM, z. B.

5'-CCCCCACCCTTCCCCTCTC-3' (XXI)

45 5'-CTCCCCCACCCTTCCCCTCTC-3' (XXII)

5'-GCTGGGAGCCATAGCGAGG-3' (XXIII)

c) ELAM-1, z. B.

50 5'-ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG-3' (XXIV)

5'-CAATCAATGACTTCAAGAGTTC-3' (XXV)

55 Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Verhinderung der Restenose. Beispielsweise können dabei Oligonucleotid-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Proliferation oder Migration verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

- 60 1) Nucleare Transaktivator-Proteine und Cycline wie beispielsweise c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, Cycline und cdc2-Kinase
2) Mitogene oder Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF, bFGF, EGF, HB-EGF und TGF-β.
3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise bFGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor.

65 Erfindungsgemäße Oligonucleotide der Formel I, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) c-myb

5'-GTGTCGGGGTCTCCGGGC-3' (XXVI)

b) c-myc

5'-CACGTTGAGGGGCGCAT-3' (XXVII)

c) cdc2-Kinase

5'-GTCTTCCATAGTTACTCA-3' (XXVIII)

d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen of rat)

5'-GATCAGGCGTGCCTCAA-3' (XXIX)

Die Arzneimittel können z. B. in Form von pharmazeutischen Präparaten, die man oral, z. B. in Form von Tabletten, Dragees, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen verabreichen kann, verwendet werden. Der Einschluß der Arzneimittel in Liposomen, die gegebenenfalls weitere Komponenten wie Proteine enthalten, ist eine ebenfalls geeignete Applikationsform. Sie können auch rektal z. B. in Form von Suppositorien oder parenteral z. B. in Form von Injektionslösungen verabreicht werden. Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können diese Verbindungen in therapeutisch inerten organischen und anorganischen Trägern verarbeitet werden. Beispiele von solchen Trägern für Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln sind Laktose, Maisstärke oder Derivate davon, Talg und Stearinsäure oder Salze davon. Geeignete Träger für die Herstellung von Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle. Geeignete Träger für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle, Wachse, Fette und halbflüssige Polyole. Die pharmazeutischen Präparate können auch Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.

Bevorzugte Verabreichungsformen sind topische Applikationen, lokale Applikationen wie beispielsweise mit Hilfe eines Katheters oder aber auch Injektionen. Zur Injektion werden die Antisense-Oligonucleotid-derivate in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z. B. Hank's Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert. Die Antisense-Oligonucleotide können aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert werden. Die für die systematische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.

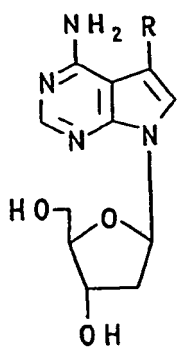
Ganz generell erstreckt sich die Erfindung auf die Verwendung von Verbindungen der Formel I als DNA-Sonden oder Primer in der DNA-Diagnostik und allgemein als Hilfsmittel in der Molekularbiologie.

Einzelne DNA-Moleküle können elektronenmikroskopisch, z. B. im Tunnelrastrermikroskop, sichtbar gemacht werden. Während Pyrimidinbasen sich aufgrund der Methylgruppe an der 5-Position elektronenmikroskopisch unterscheiden lassen ist dies bei den Purinbasen Adenin und Guanin nicht möglich. Es ist daher nicht ohne weiteres möglich, die Basensequenz von Nukleinsäuremolekülen elektronenmikroskopisch zu entschlüsseln. Enthält das zu untersuchende Nukleinsäuremolekül nun aber z. B. substituierte 7-Desazaguaninderivate statt der unmodifizierten Guaninbasen, so lassen sich die substituierten 7-Desazaguaninbasen von unsubstituierten Adeninbasen im Elektronenmikroskop unterscheiden (und umgekehrt Guaninbasen von substituierten 7-Desazaadeninbasen). Die Basensequenz von Nukleinsäuren, die 7-substituierte 7-Desazapurinbasen enthalten, kann somit mit Hilfe der Elektronenmikroskopie entschlüsselt werden.

Beispiele

Die in den Beispielen genannten Verbindungen (1)–(25) weisen folgende Strukturformel auf.

5

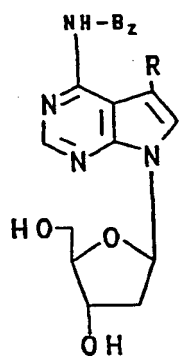


10

15

| | R |
|-----|-----------------|
| (1) | Cl |
| (2) | Br |
| (3) | CH ₃ |

20

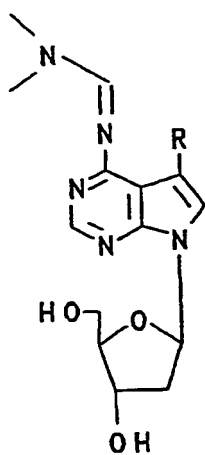


25

30

| | R |
|-----|-----------------|
| (4) | Cl |
| (5) | Br |
| (6) | CH ₃ |

35



40

45

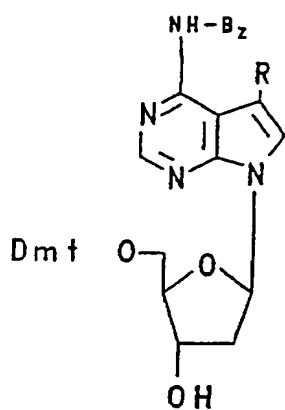
50

55

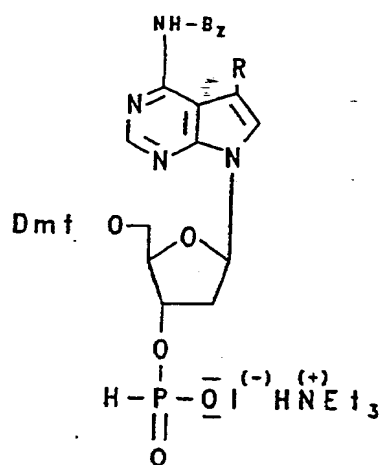
60

65

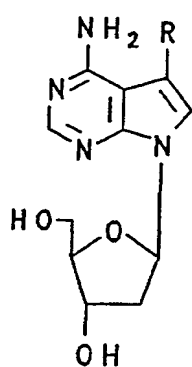
| | R |
|-----|----|
| (7) | Br |



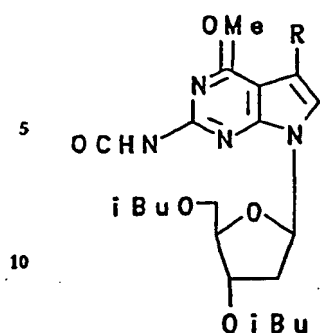
| | R |
|------|-----------------|
| (8) | Cl |
| (9) | Br |
| (10) | CH ₃ |



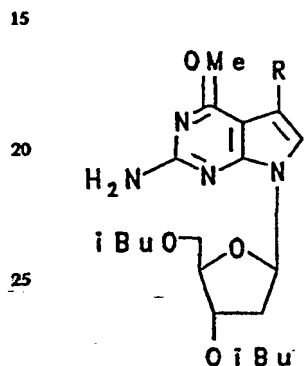
| | R |
|------|--|
| (11) | Cl |
| (12) | Br |
| (13) | CH ₃ |
| (15) | $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-\text{CF}_3$ |
| (16) | $-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH})_3\text{NHC}(=\text{O})-\text{CF}_3$ |



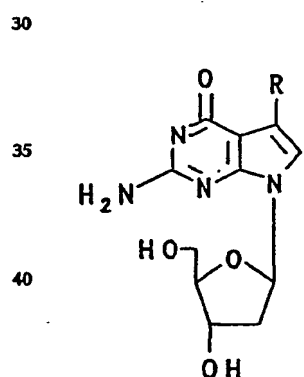
| | R |
|------|--|
| (14) | J |
| (17) | $-\text{HC}=\text{CHCO}_2\text{Me}$ |
| (23) | $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{Si}(\text{Me})_3$ |
| (24) | $-\text{C}\equiv\text{CH}$ |
| (25) | $-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_3\text{Me}$ |



| | R |
|------|----|
| (18) | H |
| (19) | Br |



| | R |
|------|----|
| (20) | Cl |



| | R |
|------|----|
| (21) | Br |
| (22) | Cl |

45 Die Herstellung der Desoxytubercidinderivate (1)–(3) (Tubercidin = 7-Desazaadenosin) erfolgt nach dem von Seela et al. [Helvetica Chimica Acta, 1994, 77, 897–903] beschriebenen Verfahren.

Beispiel 1

4-Benzoylamino-5-chlor-7-(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (4)

1.14g (4.0 mmol) 5-Chlordesoxytubercidin (1) werden zweimal mit trockenem Pyridin abgedampft, in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und anschließend mit 5.2 ml (40.6 mmol) Trimethylchlorsilan 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird mit 520 µl (4.1 mmol) frisch destilliertem Benzoylchlorid versetzt und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Unter Eiskühlung werden 4 ml Wasser und nach weiteren 5 min 8 ml 25%-iges wäßriges Ammoniak zugetropft. Der Ansatz wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 20 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, eingedampft und an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 x 5 cm, Dichlormethan/Methanol 9 : 1). Aus der langsamer wandernden Hauptfraktion erhält man nach Eindampfen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Methanol/ Wasser 930 mg (2.4 mmol, 60%) der Verbindung (4) als farblose Kristalle: Schmp. 190°C.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9 : 1): R_f = 0.4.

UV (MeOH): λ_{max} = 274 nm (5300), 305 nm (5600).

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.31 (m, 2'α-H), 2.57 (m, 2'β-H), 3.58 (m, 2H, 5'-H), 3.89 (m, 4'-H), 4.41 (m, 3'-H), 5.00 (t, J = 5.0 Hz, 5'-OH), 5.33 (d, J = 5.3 Hz, 3'-OH), 6.72 (pt, J = 6.75 Hz, 1'-H), 7.44–7.65 (m, 3H, meta- und para-H_{Bz}), 8.00 (s, 6-H), 8.05 (d, 2H, ortho-H_{Bz}), 8.72 (s, 2-H), 11.2 (br, 4-NH).

$C_{18}H_{17}ClN_4O_4$ (388.8)
Berechnet
C 55.61; H 4.41; N 14.41;
Gefunden
C 55.71; H 4.54; N 14.30.

5

Beispiel 2

4-Benzoylamino-5-brom-7-(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (5)

1.31 g (4.0 mmol) 5-Bromdesoxytubercidin (2) werden zweimal mit trockenem Pyridin abgedampft, in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und anschließend mit 5.2 ml (40.6 mmol) Trimethylchlorsilan 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird mit 520 μ l (4.1 mmol) frisch destilliertem Benzoylchlorid versetzt und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Unter Eiskühlung werden 4 ml Wasser und nach weiteren 5 min 8 ml 25%-iges wäbriges Ammoniak zuge tropft. Der Ansatz wird 30 min. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend analog zu Verbindung 14b aufgearbeitet. Nach Chromatographie an Kieselgel (Säule 20 \cdot 5 cm, Dichlormethan/ Methanol 9 : 1) erhält man nach Eindampfen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Methanol/ Wasser 1.2 g (2.8 mmol, 70%) farblose Kristalle vom Schmp. 198°C.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9 : 1): R_f = 0.4.

UV (MeOH): λ_{max} = 276 nm (4600), 308 nm (4500).

1H -NMR ($[D_6]$ DMSO): δ = 2.27 (m, 2' α -H), 2.50 (m, 2' β -H, überlagert von DMSO), 3.56 (m, 2H, 5'-H), 3.86 (m, 4'-H), 4.38 (m, 3'-H), 5.01 (t, J = 5.0 Hz, 5'-OH), 5.34 (d, J = 5.3 Hz, 3'-OH), 6.69 (pt, J = 6.7 Hz, 1'-H), 7.52–7.64 (m, 3H, meta- und para- H_{Bz}), 8.04 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.04 (s, 6-H), 8.72 (s, 2-H), 11.0 (br, 4-NH).

$C_{18}H_{17}BrN_4O_4$ (433.3)

Berechnet

C 49.90; H 3.96; N 12.93;

Gefunden

C 50.04; H 4.10; N 13.05.

Beispiel 3

4-Benzoylamino-7-(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (6)

1.06 g (4.0 mmol) 5-Methyl-desoxytubercidin (3) werden zweimal mit je 20 ml absolutem Pyridin nachgedampft, in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und mit 5.2 ml (40.6 mmol) Trimethylchlorsilan 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 520 μ l (4.1 mmol) frisch destilliertem Benzoylchlorid versetzt und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog zu Verbindung (4), anschließend wird an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 \cdot 5 cm, Dichlormethan/Methanol 9 : 1). Aus der langsamer wandernden Hauptfraktion erhält man nach Eindampfen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Methanol/ Wasser 1.1 g (2.9 mmol, 73%) farblose Kristalle (Verbindung 6) vom Schmp. 196°C.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9 : 1): R_f = 0.3.

UV (MeOH): λ_{max} = 274 nm (7050), 309 nm (5500).

1H -NMR ($[D_6]$ DMSO): δ = 2.09 (m, 2' α -H), 2.21 (s, 5-CH₃), 2.50 (m, 2' β -H, überlagert von DMSO), 3.53 (m, 2H, 5'-H), 3.83 (m, 4'-H), 4.36 (m, 3'-H), 4.97 (t, J = 5.0 Hz, 5'-OH), 5.32 (d, J = 5.3 Hz, 3'-OH), 6.65 (pt, J = 6.7 Hz, 1'-H), 7.53 (s, 6-H), 7.53–7.66 (m, 3H, meta- und para- H_{Bz}), 8.05 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.60 (s, 2-H), 10.95 (br, 4-NH).

$C_{19}H_{20}BrN_4O_4$ (368.4)

Berechnet

C 61.95; H 5.47; N 15.21;

Gefunden

C 62.08; H 5.65; N 15.00.

Beispiel 4

5-Brom-4-[(1-dimethylamino)methylen]amino-7-(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (7)

Zu einer Lösung von 200 mg (0.61 mmol) der Verbindung (2) in 15 ml Dimethylformamid gibt man 1.5 ml (8.75 mmol) N,N-Dimethylformamiddiethylacetal und läßt 2 h bei Raumtemperatur rühren. Anschließend engt man die Reaktionslösung bis zur Trockene ein und dampft den öligen Rückstand je zweimal mit Toluol und Aceton nach. Das Rohprodukt wird an Kieselgel adsorbiert und durch Säulenchromatographie gereinigt (Säule 20 \cdot 5 cm, Dichlormethan/Methanol 9 : 1). Nach Einengen der Hauptfraktion und Umkristallisation aus Aceton/ Methanol 9 : 1 erhält man Verbindung (7) als farblose Plättchen (150 mg, 0.4 mmol, 65%): Schmp. 177°C.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9 : 1): R_f = 0.65.

1H -NMR ($[D_6]$ DMSO): δ = 2.20 (m, 2' α -H), 2.50 (m, 2'(3-H, überlagert von DMSO), 3.18, 3.19 (2s, 2 N-CH₃), 3.54 (m, 2H, 5'-H), 3.86 (m, 4'-H), 4.35 (m, 3'-H), 5.01 (t, J = 5.5 Hz, 5'-OH), 5.26 (d, J = 5.0 Hz, 3'-OH), 6.57 (pt, J = 6.9 Hz, 1'-H), 7.70 (s, 6-H), 8.34 (s, 2-H), 8.82 (s, N=CH).

C₁₄H₁₈BrN₅O₃ (384.2)
 Berechnet
 C 43.77; H 4.72; N 18.23;
 Gefunden
 C 43.92; H 4.80; N 18.11.

Beispiel 5

4-Benzoylamino-5-chlor-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (8)

500 mg (1.28 mmol) von Verbindung (4) werden zweimal mit trockenem Pyridin abgedampft und anschließend in 20 ml absolutem Pyridin gelöst. Man versetzt mit 650 mg (1.95 mmol) Dimethoxytritylchlorid und rührt 1 h bei Raumtemperatur. Der Ansatz wird mit 10 ml 5%-iger wäßriger NaHCO₃-Lösung hydrolysiert und zweimal mit je 25 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ wird an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, Dichlormethan/Methanol 9 : 1). Der nach Eindampfen der Hauptzone erhaltene Rückstand liefert nach Abdampfen mit Aceton 680 mg (0.99 mmol, 77%) gelblichen Schaum. Zur Aufreinigung wird die Substanz in wenig Dichlormethan gelöst und langsam unter starkem Rühren in einen 200fachen Überschuß n-Hexan getropft. Verbindung (8) wird als weißer, amorpher Feststoff isoliert.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9 : 1): R_f = 0.5.
¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.30 (m, 2'α-H), 2.50 (m, 2'β-H, überlagert von DMSO), 3.15 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.98 (m, 4'-H), 4.42 (m, 3'-H), 5.40 (d, J = 5.0 Hz, 3'-OH), 6.69 (pt, J = 6.7 Hz, 1'-H), 6.84 (m, 4H, DMT), 7.2–7.8 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.87 (s, 6-H), 8.06 (d, 2H, ortho-H_{Bz}), 8.70 (s, 2-H), 11.0 (br, 4-NH).

C₃₉H₃₅ClN₄O₆ (691.2)
 Berechnet
 C 67.77; H 5.10; N 8.11;
 Gefunden
 C 67.70; H 5.05; N 8.19.

Beispiel 6

4-Benzoylamino-5-brom-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (9)

500 mg (1.15 mmol) von Verbindung (5) werden zweimal mit trockenem Pyridin abgedampft und anschließend in 20 ml absolutem Pyridin gelöst. Man versetzt mit 585 mg (1.75 mmol) Dimethoxytritylchlorid und rührt 1 h bei Raumtemperatur. Der Ansatz wird mit 10 ml 5%-iger wäßriger NaHCO₃-Lösung hydrolysiert und zweimal mit je 25 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ wird an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, Dichlormethan/Methanol 9 : 1). Der nach Eindampfen der Hauptzone erhaltene Rückstand liefert nach Abdampfen mit Aceton 620 mg (0.93 mmol, 80%) gelblichen Schaum. Zur Aufreinigung wird die Substanz in wenig Dichlormethan gelöst und langsam unter starkem Rühren in einen 200fachen Überschuß n-Hexan getropft. Verbindung (9) fällt als weißer, amorpher Feststoff aus und wird abgesaugt.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9 : 1): R_f = 0.55.
¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.30 (m, 2'α-H), 2.50 (m, 2'β-H, überlagert von DMSO), 3.15 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.98 (m, 4'-H), 4.42 (m, 3'-H), 5.40 (d, J = 5.0 Hz, 3'-OH), 6.69 (pt, J = 6.7 Hz, 1'-H), 6.84 (m, 4H, DMT), 7.2–7.8 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.87 (s, 6-H), 8.06 (d, 2H, ortho-H_{Bz}), 8.70 (s, 2-H), 11.0 (br, 4-NH).

C₃₉H₃₅BrN₄O₆ (735.6)
 Berechnet
 C 63.68; H 4.79; N 7.62;
 Gefunden
 C 63.85; H 4.67; N 7.52.

Beispiel 7

4-Benzoylamino-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (10)

500 mg (1.36 mmol) von Verbindung (6) werden zweimal mit je 20 ml trockenem Pyridin abgedampft, in 20 ml absolutem Pyridin gelöst und mit 690 mg (2.1 mmol) Dimethoxytritylchlorid 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird analog zu Verbindung (8) aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, Dichlormethan/Methanol 9 : 1). Aus der Hauptzone erhält man 720 mg (1.05 mmol, 77%) der vollgeschützten Verbindung (10) als gelblichen Schaum. Die Aufreinigung durch Umfällen aus n-Hexan liefert einen farblosen, amorphen Feststoff.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9 : 1): R_f = 0.5.
¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.08 (s, 5-CH₃), 2.30 (m, 2'α-H), 2.50 (m, 2'β-H, überlagert von DMSO), 3.10 (m, 2H,

5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.97 (m, 4'-H), 4.44 (m, 3'-H), 5.39 (d, J = 5.0 Hz, 3'-OH), 6.67 (pt, J = 6.7 Hz, 1'-H), 6.85 (m, 4H, DMT), 7.2–7.8 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.58 (s, 6-H), 8.06 (d, 2H, ortho-H_{Bz}), 8.60 (s, 2-H), 10.95 (br, 4-NH).

C₄₀H₃₈N₄O₆ (670.8)

Berechnet

C 71.63; H 5.71; N 8.35;

Gefunden

C 71.48; H 5.71; N 8.36.

Beispiel 8

4-Benzoylamino-5-chlor-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (11)

Unter Argonatmosphäre wird zu einer Lösung von 315 µl (3.7 mmol) Phosphortrichlorid und 4.1 ml (37.0 mmol) N-Methylmorpholin in 40 ml absolutem Dichlormethan bei Raumtemperatur 840 mg (12.0 mmol) 1,2,4-1H-Triazol gegeben. Nach 30-minütigem Rühren wird auf 0°C gekühlt und innerhalb von 10 min eine Lösung von 500 mg (0.74 mmol) des vollgeschützten Nucleosids (8) in 10 ml trockenem Dichlormethan zuge-
tropft. Man läßt weitere 10 min bei Raumtemperatur rühren und fügt anschließend 30 ml 1M Triethylammoni-
umbicarbonatpuffer (TBK, pH = 7.5) hinzu. Die Phasen werden getrennt, die wäßrige Phase mehrmals mit
CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird
abgedampft und der verbleibende Schaum an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, 0.5 l Dichlormethan/
Et₃N 98 : 2, danach Dichlormethan/ Methanol/Et₃N 88 : 10 : 2). Nach Einengen der Hauptzone wird der
Rückstand in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und fünfmal mit je 25 ml 0.1 M TBK-Puffer extrahiert. Nach
Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ und Abdampfen des Lösungsmittels erhält man 445 mg
(0.52 mmol, 70%) des Phosphonats (11) als farblosen Schaum. Zur weiteren Aufreinigung wird dieser Schaum
analog zum vollgeschützten Nucleosid (8) aus n-Hexan umgefällt. DC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9 : 1):
R_f = 0.6.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 1.16 (t, 9H, (CH₃CH₂)₃N), 2.50 (m, 2'α-H, überlagert von DMSO), 2.74 (m, 2'β-H), 3.00 (g, 6H, (CH₃CH₂)₃N), 3.33 (m, 2H, 5'-H), 3.72 (s, 6H, 2 OCH₃), 4.15 (m, 4'-H), 4.78 (m, 3'-H), 6.66 (d, J = 585.8 Hz, P-H), 6.69 (pt, J = 7.8 Hz, 1'-H), 6.84 (m, 4H, DMT), 7.2–7.7 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.79 (s, 6-H), 8.04 (d, 2H, ortho-H_{Bz}), 8.69 (s, 2-H), 10.6 (br, 4-NH). ³¹P-NMR ([D₆]DMSO): δ = 1.16 ppm (dd, ¹J(PH) = 588 Hz, ³J(PH) = 8.6 Hz. C₄₅H₅₁ClN₅O₈P (900.8).

Beispiel 9

4-Benzoylamino-5-brom-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (12)

Unter Argonatmosphäre wird zu einer Lösung von 290 µl (3.4 mmol) Phosphortrichlorid und 3.8 ml (34.0 mmol) N-Methylmorpholin in 30 ml absolutem Dichlormethan bei Raumtemperatur 770 mg (11.0 mmol) 1,2,4-1H-Triazol gegeben. Nach 30-minütigem Rühren wird auf 0°C gekühlt und innerhalb von 10 min eine Lösung von 500 mg (0.68 mmol) des vollgeschützten Nucleosids (9) in 10 ml trockenem Dichlormethan zuge-
tropft. Man läßt weitere 10 min bei Raumtemperatur rühren und fügt anschließend 30 ml 1M Triethylammoni-
umbicarbonatpuffer (TBK, pH = 7.5) hinzu. Die Phasen werden getrennt, die wäßrige Phase mehrmals mit
CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird
abgedampft und der verbleibende Schaum an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, 0.5 l Dichlormethan/
Et₃N 98 : 2, danach Dichlormethan/ Methanol/Et₃N 88 : 10 : 2). Nach Einengen der Hauptzone wird der
Rückstand in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und fünfmal mit je 25 ml 0.1 M TBK-Puffer extrahiert. Nach
Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ und Abdampfen des Lösungsmittels erhält man 410 mg
(0.46 mmol, 67%) des Phosphonats (12) als farblosen Schaum. Zur weiteren Aufreinigung kann dieser Schaum
analog zum vollgeschützten Nucleosid (9) aus n-Hexan umgefällt werden.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9 : 1): R_f = 0.7.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 1.16 (t, 9H, (CH₃CH₂)₃N), 2.50 (m, 2'α-H, überlagert von DMSO), 2.78 (m, 2'β-H), 3.00 (g, 6H, (CH₃CH₂)₃N), 3.22 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH₃), 4.17 (m, 4'-H), 4.82 (m, 3'-H), 6.68 (d, J = 588.5 Hz, P-H), 6.69 (pt, J = 6.7 Hz, 1'-H), 6.90 (m, 4H, DMT), 7.2–7.8 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.86 (s, 6-H), 8.07 (d, 2H, ortho-H_{Bz}), 8.70 (s, 2-H), 11.05 (br, 4-NH). ³¹P-NMR ([D₆]DMSO): δ = 1.16 ppm (dd, ¹J(PH) = 588 Hz, ³J(PH) = 8.6 Hz). C₄₅H₅₁BrN₅O₈P (900.8).

Beispiel 10

4-Benzoylamino-7-[(2-desoxy-β-D-erythropentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (13)

Unter Argonatmosphäre werden zu einer Lösung von 25 ml absolutem Dichlormethan, 290 µl (3.4 mmol) Phosphortrichlorid und 3.44 g (34.0 mmol) N-Methylmorpholin bei Raumtemperatur 0.78 g (11.3 mmol) 1,2,4-H-Triazol gegeben. Nach 30-minütigem Rühren wird die Reaktionslösung auf 0°C abgekühlt und innerhalb

von 10 min mit einer Lösung von 500 mg (0.75 mmol) des vollgeschützten Nucleosids (10) in 15 ml Dichlormethan versetzt. Man läßt weitere 20 min bei Raumtemperatur rühren und hydrolysiert anschließend mit 1 M Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TBK, pH = 7.5). Nach Phasentrennung, dreimaliger Extraktion der wäßrigen Phase mit je 20 ml Dichlormethan, Trocknen und Eindampfen der organischen Phase wird an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 × 5 cm, 0.5 l Dichlormethan/ Et₃N-98 : 2, danach Dichlormethan/Methanol/ Et₃N 88 : 10 : 2). Die Hauptzone wird eingedampft, in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und mehrmals mit 0.1 M TBK-Puffer extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ und Abdampfen des Lösungsmittels erhält man 440 mg (0.53 mmol, 70%) der Verbindung (13) als farblosen Schaum.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9 : 1): R_f = 0.65.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 1.16 (t, 9H, (CH₃CH₂)₃N), 2.09 (s, 5-CH₃), 2.24 (m, 2'α-H), 2.67 (m, 2'(3-H)), 3.00 (g, 6H, (CH₃CH₂)₃N), 3.20 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH₃), 4.13 (m, 4'-H), 4.83 (m, 3'-H), 6.65 (pt, J = 6.5 Hz, 1'-H), 6.68 (d, J = 588.5 Hz, P-H), 6.85 (m, 4H, DMT), 7.2–7.6 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.58 (s, 6-H), 8.05 (d, 2H, ortho-H_{Bz}), 8.60 (s, 2-H), 10.98 (br, 4-NH).

³¹P-NMR ([D₆]DMSO): δ = 1.08 ppm (dd, ¹J(PH) = 577 Hz, ³J(PH) = 8.9 Hz). C₄₆H₅₄N₅O₈P (835.8).

Beispiel 11

4-Amino-5-brom-7-(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin 5'-O-Triphosphat, Triethylammoniumsalz

Verbindung (2) (33 mg, 0.1 mmol) wird zusammen mit 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (33 mg, 0.15 mmol) in Trimethylphosphat (0.25 ml) unter leichtem Erwärmen in Lösung gebracht. Nach Abkühlen auf 0°C erfolgt eine Zugabe von frisch destilliertem POCl₃ (12 µl, 0.13 mmol). Die Reaktion wird für 4 h bei 4°C gehalten und anschließend eine Lösung aus Tri-n-butylammoniumdiphosphat (0.5 m in DMF, 1 ml) und Tri-n-butylamin (100 µl, 0.42 mmol) zugegeben. Nach 3 min Rühren bei 0°C wird die Mischung mit 1 M TBK-Puffer (10 ml) versetzt und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird an DEAD Sephadex (Säule 1.5 × 20 cm, HCO₃-Form) chromatographiert. Nach Waschen mit ca. 500 ml H₂O wurde mit einem linearen Gradienten von H₂O/0.9 M TBK-Puffer (je 1 l) chromatographiert. Dabei erhält man das Triphosphat (0.019 mM, 20%) bei ca. 0.5 M TBK-Puffer.

DC (Kieselgel, i-Propanol/H₂O/NH₃, 3 : 1 : 1): R_f = 0.2.

UV (H₂O): λ_{max} = 269 nm.

³¹P-NMR (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA/D₂O): -11.87 (d, J = 20.2, P_γ); -10.98 (td, J = 20.0 und 6.0, P_α); -23.06 (t, J = 20.2, P_β).

Beispiel 12

4-Amino-7-(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-jod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (14) (5-Jod-2'-desoxytubercidin)

Zu 1.0 g (2.5 mmol) 4-Chlor-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(4-toluoyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-jod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin, gelöst in 80 ml Dioxan (80 ml), wird 25%iges wäßriges Ammoniak hinzugegeben. Der Ansatz wird 48 h bei 110°C in einer Stahlbombe gerührt. Nach Abdampfen wird der eingeeengte Rest auf Kieselgel chromatographiert (Säule 20 × 5 cm, Lösungsmittel B). Farblose Kristalle von MeOH (0.75 g, 2.0 mmol, 45%). M.p. 194°C. TLC: R_f 0.4 (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1). UV (MeOH) 283 nm (ε 800).

¹H-NMR (D₆-DMSO): 2.16 (m, H-2'α), 2.46 (m, H-2'β), überlagert von DMSO), 3.54 (m, 2-H, H-5'), 3.81 (m, H-4'), 4.33 (m, H-3'), 5.00 (t, J = 5.1 Hz, 5'-OH), 5.23 (d, J = 5.1 Hz, 3'-OH), 6.49 (pt, J = 6.7 Hz, H-1'), 6.65 (br, NH₂), 7.65 (s, H-6), 8.10 (s, H-2).

¹³C-NMR (D₆-DMSO) 157.3 (C-4), 152.0 (C-2), 149.8 (C-7a), 126.9 (C-6), 103.2 (C-4a), 87.5 (C-4'), 83.0 (C-1'), 71.0 (C-3'), 62.0 (C-5'), 51.9 (C-5), 39.8 (C-2').

Anal. berechnet für C₁₁H₁₃IN₄O₃: C 35.13, H 3.48, N 14.90; gefunden: C 35.33, H 3.69, N 15.01.

Beispiel 13

Kreuzkupplungsreaktion von 5-Jod-2'-Desoxytubercidin (14)

5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) (200 mg, 0.532 mmol) und Kupfer(I)Jodid (10 mg, 10 mol%) werden in 3 ml trockenem, mit Argon vorgespülten DMF suspendiert und mit Alkin (6–15 eq.), trockenem Triethylamin (108 mg, 1.06 mmol, 2 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0) (30.75 mg, 0.027 mmol, 5 mol%) versetzt.

Innerhalb einiger Stunden entsteht aus der Mischung eine klare gelbe Lösung. Die Reaktion wird solange fortgeführt, bis die Ausgangsprodukte verbraucht sind (Überprüfung mittels Dünnschichtchromatographie). Das Reaktionsgemisch wird dann mit 5 ml Methanol-Dichlormethan (1 : 1) verdünnt und mit Dowex 1 × 8 (100–200 mesh; 500 mg, Bicarbonatform) versetzt. Nachdem nach 15 Minuten Rühren die Gasbildung zum Stillstand kommt wird noch für weitere 30 Minuten gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch filtriert und die Matrix mit Methanol-Dichlormethan (1 : 1) gewaschen.

Die Filtrate werden vereinigt und getrocknet. Der getrocknete Rückstand wird sofort über eine Kieselgelsäule (25 g) unter Verwendung von Dichlormethan mit zunehmenden Gehalt von Methanol (10, 15, 20%) chromatographiert. Nach Eindampfen der Hauptfraktion erhält man das substituierte 2'-Desoxytubercidinderivat.

Beispiel 14

4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (15)

a) 7-Desaza-2'-desoxy-7-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-adenosin

5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) aus Beispiel 12 wird unter den in Beispiel 13 beschriebenen Bedingungen über 9 h an N-Propargyltrifluoracetamid gekoppelt. Folgende Mengen werden eingesetzt: 5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) (200 mg, 0.532 mmol), Kupfer(I)jodid (5.0 mg, 0.0236 mmol, 5 mol%), DMF (3 ml), N-Propargyltrifluoracetamid (482 mg, 3.2 mmol, 6 eq.), Triethylamin (108 mg, 1.06 mmol, 2 eq.), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0) (61.5 mg, 0.0532 mmol, 10 mol%).

Nach Chromatographie wird der Feststoff aus Ethylacetat umkristallisiert:

Blaßgelbe Kristalle (70 mg, 0.176 mmol, 33%). M.p. 187–188°C. TLC: R_f 0.30 (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1). UV (MeOH) 237 (14400), 279 (14 200).

¹H-NMR (D₆-DMSO) 10.07 (s, 1H, NHTFA), 8.12 (s, 1H, H-2), 7.76 (s, 1H, H-6), 6.79 (broad s, 2H, NH₂), 6.49 (pt, 1H, H-1', J 6.6 Hz), 5.25 (d, 1H, 3'-OH, J 3.0 Hz), 5.05 (t, 1H, 5'-OH, J = 4.5 Hz), 4.35 (m, 1H, H-3'), 4.32 (d, 2H, CH₂, J = 4.2 Hz), 3.84 (m, 1H, H-4'), 3.56 (m, 2H, H-5'), 2.47 (m, 1H, H-2'β), 2.19 (m, 1H, H-2'α).

¹³C-NMR (D₆-DMSO): 157.4 (C-4), 159.4 und 156.1 (C=O), 152.7 (C-2), 149.2 (C-7a), 126.5 (C-6), 116.8 und 114.6 (CF₃), 102.2 (C-4a), 94.0 (C-5), 87.5 (C-4'), 86.7 and 76.2 (C=C), 83.2 (C-1'), 70.9 (C-3'), 61.8 (C-5'), 39.6 (C-2', überlagert von DMSO), 29.9 (CH₂).

Anal. berechnet für C₁₆H₁₆F₃N₅O₄: C 48.13, H 4.04, N 17.54; gefunden: C 48.26, H 4.13, N 17.58.

b)

4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin

Die Einführung der Benzoylamino Schutzgruppe in 7-Desaza-2'-desoxy-7-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-adenosin erfolgt analog zu Beispiel 1.

c)

4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin

Die Einführung der Dmt-Hydroxylschutzgruppe in 4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin erfolgt analog zu Beispiel 5.

d) Die Titelverbindung (15) wird analog zu Beispiel 8 aus

4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin hergestellt.

Beispiel 15

4-Benzoylamino-5-(1-pentinyl-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (16)

a) 7-Desaza-2'-desoxy-7-(1-pentinyl-trifluoracetamid)-adenosin

5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) aus Beispiel 12 wird unter den in Beispiel 13 beschriebenen Bedingungen über 48 h an 5-Trifluoracetamid-1-pentin gekoppelt. Folgende Mengen werden eingesetzt: 5-Jod-2'-Desoxytubercidin (200 mg, 0.532 mmol), Kupfer(I)jodid (5 mg, 0.0236 mmol, 5 mol%), DMF (3 ml), 5-Trifluoracetamid-1-pentin (953 mg, 5.32 mmol, 10 eq.), Triethylamin (108 mg, 1.06 mmol, 2 eq.), Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0) (61.5 mg, 0.0532 mmol, 10 mol%). Nach Chromatographie wird durch Kristallisation aus der Flüssigkeit ein schwach gelblicher öliger Rückstand (84.1 mg, 0.197 mmol, 37%) erhalten. M.p. 51–52°C. TLC: R_f 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1). UV (MeOH) max = 239 (14 300), 280 (10 900). ¹H-NMR (D₆-DMSO): 8.08 (s, 1H; H-2), 7.64 (s, 1H, H-6), 6.46 (pt, 1H, H-1', J = 6.9 Hz), 4.32 (m, 1H, H-3'), 3.80 (m, 1H, H-4'), 3.59–3.28 (mehrere m, 5H, H-5', CH₂—CH₂—CH₂—N), 2.47 (m, 1H, H-2'β), 2.17 (m, 1H, H-2'α), 1.76 (Quintett, 2H, CH₂—CH₂—CH₂—N). ¹³C-NMR (D₆-DMSO): 157.6 (C-4), 156.5 and 156.2 (C=O), 152.7 (C-2), 149.2 (C-7a), 125.7 (C-6), 118.5 and 114.0 (CF₃), 102.3 (C-4a), 95.5 (C-5), 91.6 (C=C, 11), 87.6 (C-4'), 83.2 (C-1'), 74.0 (C=C, 2'), 71.0 (C-3'), 62.0 (C-5'), 39.6 und 38.6 (C-2' und CH₂ überlagert durch DMSO), 27.7 (CH₂), 16.6 (CH₂).

Anal. berechnet für C₁₈H₂₀N₅O₄F₃: C 50.59, H 4.72, N 16.39; gefunden: C 50.65, H 4.82, N 16.32.

Die Titelverbindung (16) wird aus 7-Desaza-2'-desoxy-7-(1-pentinyl-trifluoracetamid)-adenosin analog zu Beispiel 14b), 14c) und 14d) erhalten.

Beispiel 16

2'-Desoxy-7-desaza-7-(2-carboxyethenyl)-adenosin (17)

5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) aus Beispiel 12 wird unter den in Beispiel 13 beschriebenen Bedingungen über 65 h an Methylacrylat gekoppelt. Folgende Mengen werden eingesetzt: 5-Jod-2'-Desoxytubercidin (200 mg, 0.532 mmol), Kupfer(I)-jodid (5 mg, 0.0236 mmol, 5 mol%), DMF (3 ml), Triethylamin (108 mg, 1.06 mmol, 2 eq.), Methylacrylat (686 mg, 8.0 mmol, 15 eq.), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (O) (61.5 mg, 0.0532 mmol, 10 m %). Nach chromatographischer Aufreinigung wird ein blaßgelber Schaum erhalten und nach Waschen mit Dichlormethan werden 71.1 mg Festsubstanz erhalten (40%). M.p. 101–102°C. TLC: R_f 0.40 (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1). UV (MeOH) Max = 268.0 (13 500), 324.8 (11 900).

¹H-NMR (D₆-DMSO): 8.11 (2s, 2H, H-2 and H-6), 7.94 (d, 1H, H-1'', J 15.6 Hz), 6.86 (s, 2H, NH₂), 6.51 (pt, 1H, H-1', J = 6.6 Hz), 6.4 (d, 1H, H-2'', J = 15.6 Hz), 5.26 (d, 1H, 3'-OH, J 3.6 Hz), 5.04 (t, 1H, 5'-OH, J 5.1 Hz), 4.36 (m, 1H, H-3'), 3.83 (m, 1H, H-4'), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.55 (m, 1H, H-5'), 2.45 (m, 1H, H-2'β), 2.22 (m, 1H, H-2'α).

¹³C-NMR (D₆-DMSO): 166.9 (C=O), 158.0 (C-4), 152.1 (C-2), 151.2 (C-7a), 137.4 (CH-C=O), 123.7 (C-6), 115.5 (CH=CH-C=O), 111.5 (C-5), 101.0 (C-4a), 87.6 (C-4'), 83.2 (C-1'), 70.9 (C-3'), 62.0 (C-5'), 51.2 (OCH₃), 39.6 (C-2', überlagert durch DMSO).

Anal. berechnet für C₁₅H₁₈N₄O₅: C 53.89, H 5.43, N 16.76; gefunden: C 53.79, H 5.56, N 16.74.

Beispiel 17

7-[2-Desoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-[(formyl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (18)

7-(2-Desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-4-methoxy-2-[(formyl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (1.0 g, 3.3 mmol) [F. Seela, H. Driller, Nucleosides, Nucleotides 1989, 8, 1–21] in Acetonitril (20 ml) wurde bei Raumtemperatur mit Isobuttersäureanhydrid (33 mmol) in Gegenwart von Triethylamin (23 mmol) 15 Stunden lang gerührt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und mit Methanol nachgedampft. Der Rückstand wird im Laufmittel Methylenchlorid/Aceton (95 : 5) chromatographiert, die Hauptzone isoliert und der Inhaltsstoff aus Cyclohexan umkristallisiert. 1.26 g (89%) farbloser Feststoff.

¹H NMR ([D₆]DMSO), δ: 1.05–1.14 (m, 4CH₃), 2.60, 2.90 (m, CH und 2'-Ha,b), 4.02 (s, OCH₃), 4.16 (m, 5'-H), 4.26 (m, 4'-H), 5.35 (m, 3'-H), 6.47 (m, 1'-H), 6.52 (d, 5-H), 7.39 (d, 6-H), 9.44 (d, NH), 10.71 (d, HCO).

Beispiel 18

5-Brom-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-[(formyl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (19)

Eine Lösung von Verbindung 2 (10.1 mmol) in Dimethylformamid wurde mit H-Bromsuccinimid (10.1 mmol) bei Raumtemperatur 1 Stunde gerührt. Zum Abpuffern wird die Lösung mit einigen Tropfen 5%igem wäßrigem NaHCO₃ versetzt und dann Methylenchlorid hinzugefügt. Die organische Phase wird mit Wasser gegengeschüttelt, separiert, über Natriumsulphat getrocknet und abgedampft. Die Chromatographie des Rückstandes an einer Kieselgelsäule im Laufmittel Dichlormethan/Aceton (95 : 5) führt zu zwei Zonen. Der Abdampfrückstand der langsam wandernden Hauptzone liefert farbloses (19) (75%) als Feststoff.

¹H NMR ([D₆]DMSO), δ: 1.05–1.14 (m, 4CH₃), 2.60, 2.88 (m, CH und 2'-Ha,b), 4.04 (s, OCH₃), 4.16 (m, 5'-H), 4.22 (m, 4'-H), 5.34 (m, 3'-H), 6.46 (m, 1'-H), 7.60 (s, 6-H), 9.43 (s, NH), 10.86 (s, HCO).

Aus der schnell wandernden Nebenzone der oben genannten Reaktion wird ein farbloser Feststoff erhalten der als 5,6-Dibrom-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(2-methylprobiopyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-[(formyl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin charakterisiert wurde.

¹H NMR ([D₆]DMSO), δ: 0.99–1.13 (m, 4CH₃), 2.59, 3.58 (m, CH und 2'-Ha,b), 4.03 (s, OCH₃), 4.16 (m, 5'-H), 4.30 (m, 4'-H), 5.56 (m, 3'-H), 6.39 (m, 1'-H), 9.42 (s, NH), 10.91 (s, HCO).

Beispiel 19

5-Chlor-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-amino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (20)

Die Substanz wurde unter Verwendung von N-Chlorsuccinimid analog der Verbindung (19) dargestellt und aufgearbeitet. Die Reaktionszeit der Halogenierung betrug 8 Stunden. Als Lösungsmittel wurde Acetonitril/DMF (4 : 1) verwandt. Farbloser Feststoff (70%).

¹H NMR ([D₆]DMSO), δ: 1.07–1.13 (m, 4CH₃), 2.59, 2.74 (m, CH und 2'-Ha,b), 3.93 (s, OCH₃), 4.15 (m, 5'-H), 4.21 (m, 4'-H), 5.25 (m, 3'-H), 6.39 (m, 1'-H), 6.47 (s, NH₂), 7.20 (s, 6-H).

Als Nebenprodukt entstand als farbloser Feststoff die Verbindung 5,6-Dichlor-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-amino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin.

¹H NMR ([D₆]DMSO), δ: 1.03–1.13 (m, 4CH₃), 2.58, 3.40 (m, CH und 2'-Ha,b), 3.93 (s, OCH₃), 4.16 (m, 5'-H), 4.37 (m, 4'-H), 5.44 (m, 3'-H), 6.37 (m, 1'-H), 6.58 (s, NH₂).

Beispiel 20

2-Amino-7-(2'-desoxy-β-erythro-pentofuranosyl)-3,7-dihydro-5-brom-4-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (21)

Die Verbindung (19) wird nach einem bekannten Verfahren umgesetzt [F. Seela, B. Westermann, U. Bindig,].

Chem. Soc. Perkin Trans I 1988, 699]. 500 mg der Verbindung (19) wird in 200 ml 2NaOH 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wird mit Eisessig neutralisiert, der anorganische Rückstand wird abfiltriert und die wässrige Phase abgedampft. Umkristallisation aus Wasser liefert farblose Kristalle von (21).

Beispiel 21

2-Amino-7-(2'-desoxy- β -erythro-pentofuranosyl)-3,7-dihydro-5-brom-4-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (22)

Die Verbindung (22) wird ausgehend von der Verbindung (20) analog zu dem im Beispiel 20 beschriebenen Verfahren hergestellt. Umkristallisation aus Wasser liefert farblose Kristalle von (22).

Beispiel 22

4-Amino-7-[2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl]-5-trimethylsilylethynyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (23)

Verbindung (23) wird nach der allgemeinen Vorschrift der Kreuzkupplungsreaktion in Beispiel 13 aus Trimethylsilylacetylen dargestellt. Farbloser Feststoff. Ausbeute 54%

Berechnet C 55.47, H 6.40, N 16.17, C 55.57, H 6.53, N 16.20.

^1H NMR (DMSO): 8.12 (s, 1H, H-2), 7.80 (s, 1H, H-6), 6.76 (breit, 2H, NH_2), 6.47 (t , 1H, H-1', J = 6.7 Hz), 5.23 (d, 1H, 3'-OH, J = 3.3 Hz), 5.07 (t, 1H, 5'-OH), 4.33 (m, 1H, H-3'), 3.87 (m, 1H, H-4'), 3.54 (m, 2H, H-5'), 2.46 (m, 1H, H-2'), 2.17 (m, 1H, H-2'), 0.73 (s, 9H, Me).

Beispiel 23

4-Amino-7-[2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl]-5-ethynyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (24)

200 mg der Verbindung (23) werden in 20 ml MeOH gelöst. Zugabe von 8 mg K_2CO_3 führt nach 1h Rühren zur Hydrolyse. Nach Einrotieren der Lösung wird der Rückstand an Kieselgel im Laufmittel Methylenchlorid/MeOH (8 : 1) chromatographiert. Umkristallisation aus MeOH führt zu farblosen Kristallen (73%).

Berechnet C 56.93, H 5.15, N 20.43, C 56.77, H 5.71, N 20.42.

^1H NMR (DMSO): 8.13 (s, 1H, H-2), 7.81 (s, 1H, H-6), 6.65 (breit, 2H, NH_2), 6.49 (t, 1H, H-1'), 5.25 (m, 1H, 3'-OH), 5.05 (m, 1H, 5'-OH), 4.36 (m, 1H, H-3'), 4.26 (s, 1H, Ethin), 3.84 (s, 1H, H-4'), 3.56 (m, 2H, H-5'), 2.47 (m, 1H, H-2'), 2.21 (m, 1H, H-2').

Beispiel 24

4-Amino-7-[2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl]-5-hexinyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (25)

Verbindung (25) wird nach der allgemeinen Vorschrift der Kreuzkupplungsreaktion (Bsp. 13) unter Verwendung von 1-Hexin hergestellt. Umkristallisation aus MeOH führt zu farblosen Kristallen (Ausbeute: 48%).

Berechnet C 61.80, H 6.71, N 19.96; Gefunden C 61.68, H 6.60, N 16.90.

^1H NMR (DMSO) 8.31 (s, 1H, H-2), 7.65 (s, 1H, H-6), 6.65 (breit, 2H, NH_2), 6.49 (t , 1H, H-1'), 5.24 (m, 1H, 3'-OH), 5.05 (m, 1H, 5'-OH), 4.50 (m, 1H, 3'-H), 3.84 (m, 1H, H-4'), 3.56 (m, 2H, H-5'), 2.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2.46 (m, 1H, H-2'), 2.18 (m, 1H, H-2') 1.54 (m, 2H, CH_2), 1.43 (m, 2H, CH_2), = 0.93 (m, 2H, CH_3).

Beispiel 25

2-Amino-6-chlor-7[2-desoxy-3,5-di-O-acetyl- β -D-erythropentofuranosyl]-4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin

Eine Lösung von 50 mg (0.14 mmol) 2-Amino-7(2-desoxy-3,5-di-O-acetyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)-4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin in 3 ml Dichlormethan werden mit 36.6 mg (0.27 mmol) N-Chlorsuccinimid versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der Rückstand an Kieselgel in CH_2Cl_2 /Aceton (9 : 1) chromatographiert.

Aus der langsam wandernden Hauptzone erhält man 30 mg (54%) farblosen Schaum.

^1H -NMR D_6 (DMSO): 1.99 (s, 3H, CH_3), 2.09 (s, 3H, CH_3), 2.37 (m, 1H, H-2'b), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 4.18 (m, 2H, H-5'), 4.43 (m, 1H, H-4'), 5.44 (m, 1H, H-3'), 6.38 (m, 1H, H-1'), 6.42 (s, 1H, H-5).

^{13}C -NMR (DMSO): 20.48 (CH_3), 20.76 (CH_3), 33.78 (C-2'), 52.99 (OCH_3), 63.47 (C-5'), 74.31 (C-3'), 80.91 (C-4'), 82.95 (C-1'), 96.45 (C-4a), 98.65 (C-5), 118.12 (C-6), 153.69 (C-7a), 159.25 (C-2), 162.16 (C-4), 169.98 (C=O), 170.09 (C=O).

Beispiel 26

2-Amino-5,6-dichlor-7[2-desoxy-3,5-di-O-acetyl- β -D-erythropentofuranosyl]-4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin

Die schneller wandernde Zone liefert einen farblosen Schaum. 6 mg (9.9%).

^1H -NMR (DMSO): 1.98 (s, 3H, CH_3), 2.07 (s, 3H, CH_3), 2.24 (m, 1H, H-2'b), 2.73 (m, 1H, H-2'a), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 4.14 (m, 2H, H-5'), 4.39 (m, 1H, H-4'), 5.40 (m, 1H, H-3'), 6.39 (m, 1H, H-1'), 6.59 (s, 2H, NH_2).

¹³C-NMR (DMSO): 20.47 (CH₃), 20.75 (CH₃), 34.06 (C-2'), 53.34 (OCH₃), 63.41 (C-5'), 74.09 (C-3'), 81.01 (C-4'), 83.26 (C-1'), 94.59 (C-4a), 102.08 (C-5), 115.16 (C-6), 151.94 (C-7a), 159.59 (C-2), 162.08 (C-4), 169.97 (C=O), 170.07 (C=O).

UV (MeOH): λ_{max} (E): 290 nm (8500), 264 nm (13100), 226 nm (22700).

5

Beispiel 27

Festphasensynthese der Oligodesoxyribonucleotide nach der Phosphonat-Methode

Die Oligodesoxyribonucleotidsynthesen wurden im 1 μmol Maßstab mittels der Phosphonat-Technik an einem automatisierten DNA-Synthesizer Modell 380 B (Applied Biosystems, Weiterstadt) an fester Phase (CPG: *Controlled Pore Glass), wobei das DNA-Fragment in 3'-5'-Richtung synthetisiert wurde, durchgeführt. Der Reaktionsszyklus (Detritylierung, Kupplung, Cappen und Oxidation) folgte dabei einem für die Phosphonat-Chemie entwickelten Programm [H. Köster, K. Kulikowsky, T. Liese, W. Heikens, V. Kohli, Tetrahedron 1981, 37, 363.]. Das basen- und an der 5'-Hydroxylgruppe Dmt geschützte Oligonucleotid wurde durch 25% wässrigem Ammoniak innerhalb von 30 min vom Träger abgespalten. Die Schutzgruppen an den Heterozyklen wurden im gleichen Medium innerhalb von 48h bei 60°C entfernt. Die Proben wurden unter Zugabe eines Tropfens Triethylamin (Vermeidung der vorzeitigen Abspaltung der 5'-OH Schutzgruppe) in einem Speed-Vac *Konzentrator auf etwa 200 μl eingengt. Sie sind so bei -25°C einige Monate haltbar.

20

Beispiel 28

Festphasensynthese der Oligodesoxyribonucleotide nach der Phosphoramidit-Methode.

Die Oligodesoxyribonucleotidsynthesen wurden im 1 μmol Maßstab mittels der Festphasen-Phosphoramidit-Technik an einem automatisierten DNA-Synthesizer Modell 380 B (Applied Biosystems, Weiterstadt) mit Hilfe von *CPG (Controlled Pore Glass) oder *Fractosil, das die erste Nucleosid-Einheit über das 3'-Ende gebunden hält, durchgeführt. Dabei wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Waschen mit Acetonitril abs.
2. Behandeln mit 3% Trichloressigsäure in Dichlormethan
3. Waschen mit Acetonitril abs.
4. Kondensation mit 10 μmol 5'-O-Dimethoxytritylnucleosid-3'-phosphorigsäure-β-cyanoethylester-diisopropylamidit und 50 μmol Tetrazol in 0.3 ml Acetonitril abs.
5. Waschen mit Acetonitril
6. Capping mit 20% Acetanhydrid in THF mit 40% Lutidin und 10% Dimethylaminopyridin
7. Waschen mit Acetonitril
8. Oxidation mit Jod (1.3 gr in THF/Wasser/Pyridin; 70 : 20 : 5 = v.v.v)

Die Schritte 1 bis 8, nachfolgend ein DNA-Reaktionszyklus genannt, wurden zum Aufbau des Oligonucleotids entsprechend der zu synthetisierenden Sequenz wiederholt, wobei in Schritt 4 jeweils das der Sequenz entsprechende 5'-O-Dimethoxytrityl(nucleobase)-3'-phosphorigsäure-β-cyanoethylester-diisopropylamidit eingesetzt wurde. Nach abgeschlossener Synthese erfolgt die Aufarbeitung wie in Beispiel 27 beschrieben.

Beispiel 29

45

HPLC-Aufreinigung der tritylgeschützten sowie entschützten Oligonucleotide

Im ersten Reinigungsschritt wurden die DMT-geschützten Oligomere über HPLC an RP-18-Kieselgel aufgereinigt (Laufmittelsystem I, s. u.), bis zur Trockene eingedampft, mehrmals mit trockenem Methanol nachgedampft und anschließend unter Eiskühlung durch 10-minütiges Einwirken von 80%-iger Essigsäure detrityliert. Daraufhin wurde die Säure tropfenweise bei 0°C mit Triethylamin (1-2 ml) neutralisiert, bis fast zur Trockene eingengt und zweimal mit absolutem Methanol nachgedampft. Nach Aufnahme des Rückstands in 500 μl bidestilliertem Wasser wurden die vollständig entschützten Oligonucleotide erneut über RP-18-Kieselgel per HPLC aufgereinigt (Laufmittelsystem II, s. u.). Die vereinigten Hauptzonen wurden abgedampft, der Rückstand in 500 μl bidestilliertem Wasser gelöst und über eine kurze RP-18-Säule entsalzt (Laufmittelsystem III, s. u.). Nach Lyophilisierung im Speed-Vac-Konzentrator wurden die Oligonucleotide in 100 μl bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei -25°C gelagert.

Es wurden folgende HPLC-Laufmittel verwendet:

A: 0.1 M Triethylammoniumacetat pH 7.01 5%-ig an Acetonitril

B: bidestilliertes Wasser

C: Acetonitril

D: Methanol/ Wass r 3 : 2

Folgende Gradienten-Systeme bestehend aus den obigen Laufmitteln wurden eingesetzt:

I: 3 min. 15% C in A, 7 min. 15-40% C in A, 5 min. 40% C in A, 5 min. 40-15% C in A

II: 20 min. 0-20% C in A, 5 min. 20% C in A

III: 100% A

IV: 30 min. B, 10 min. D

V: 12 min. 100% A, 8 min. 0-40% C in A, 5 min. 40-0% C in A

Folgende Retentionszeiten n der Oligomere wurden beobachtet:
HPLC-Retentionszeiten der synthetisierten Oligonucleotide:

| Oligomer (5'→3'-Richtung) | Retentionszeiten [min] | | |
|---|------------------------|-------------|----|
| | mit Trityl | ohne Trityl | |
| d(A ₁₂) | 11.6 | 15.5 | 5 |
| d(T ₁₂) | 11.5 | 13.7 | 10 |
| d(c ⁷ A ₁₁ A) | 12.3 | 15.3 | 15 |
| d(Br ⁷ c ⁷ A ₁₁ A) | 12.7 | 19.1 | |
| d(Me ⁷ c ⁷ A ₁₁ A) | 12.2 | 18.1 | 20 |
| d(A-T) ₆ | 13.5 | 20.1 | |
| d(c ⁷ A-T) ₆ | 13.6 | 20.5 | |
| d(Cl ⁷ c ⁷ A-T) ₆ | 12.8 | 19.9 | 25 |
| d(Br ⁷ c ⁷ A-T) ₆ | 12.3 | 17.8 | |
| d(Me ⁷ c ⁷ A-T) ₆ | 12.6 | 17.9 | 30 |

Beispiel 30

Charakterisierung der Oligodesoxyribonukleotide durch enzymatische Hydrolyse

Die Oligonucleotide (je 0.5 A₂₆₀-Einheiten) werden in 0.1 M Tris-HCl-Puffer (pH = 8.3, 200 µl) gelöst und mit Schlangengift-Phosphodiesterase (3 µg) 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit alkalischer Phosphatase (3 µg) versetzt und weitere 30 min die Temperatur bei 37°C gehalten. Die entstehende Nucleosid-Mischung wird mit Hilfe der Reversed-Phase-HPLC (Laufmittelsystem V) UV-spektrophotometrisch analysiert. Basierend auf den Peakflächen und den Extinktionskoeffizienten der Nucleoside bei 260 nm (dA: 15400, dC: 7300, dG: 11700, dT: 8800, Brdc⁷A: 5300, Medc⁷A: 4900, Clc⁷A: 6300) kann die Nucleosidzusammensetzung des entsprechenden Oligonucleotids quantifiziert werden.

Beispiel 31

Bestimmung der Spalthypochromizität durch enzymatische Hydrolyse der Oligonucleotide

0.2 A₂₆₀-Einheiten des Oligonucleotids werden in 0.1 M Tris-HCl-Puffer (pH = 8.3, 200 µl) mit Schlangengift-Phosphodiesterase hydrolysiert. Aus der UV-Absorption bei 260 nm vor und nach der Spaltung läßt sich die Hypochromizität in % unter Berücksichtigung der Enzymabsorption nach folgender Gleichung berechnen:

$$H_{\text{enzym}} = [(\epsilon_{\text{monomer}} - \epsilon_{\text{polymer}}) \cdot (\epsilon_{\text{monomer}})^{-1}] \cdot 100\%.$$

Beispiel 32

UV- und CD-spektroskopische Bestimmung der T_m-Werte und Berechnung der thermodynamischen Daten

Die Ermittlung der T_m-Werte der Oligomere erfolgte an einem Cary 1 UV-Vis Spektrophotometer (Varian, Melbourne, Australien). Die Temperatur wurde mit 0.5°C bzw. 1.0°C pro Minute linear variiert. Zur Untersuchung der Schmelztemperatur wurden Oligomerkonzentrationen zwischen 0.2–0.8 A₂₆₀-Einheiten in 1 ml 60 mM Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7.5, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂) verwendet. Die Einzelstrang-Konzentration betrug bei den Experimenten an den nicht selbstkomplementären Oligonucleotiden 0.2–0.6 OD. Die Schmelzhypochromizität in % ergibt sich aus der Absorptionsänderung vor und nach dem Aufschmelzen nach folgender Gleichung:

$$H_{\text{Schm}} = [(A_c - A_t) A_c^{-1}] \times 100.$$

Die Analyse der Schmelzkurven erfolgte mit einem Programm ausgehend von einem Zweizustandsmodell ("stacked/unstacked") entsprechend der Gleichung:

$$\ln K = \ln [(E^s - E)/(E^u - E)] = S/R - H/RT$$

mit E = Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge, S = "stacked" und U = "unstacked". Die temperaturabhängigen CD-Spektren wurden an einem Jasco 600 Spektropolarimeter mit temperierbarer Quarz-Küvette in einem Wellenlängenbereich von 200–350 nm aufgenommen. Die Temperaturerhöhung wurde in Intervallen von 5–10°C in einem Bereich von 5–80°C in Konzentrationen von 3–15 μ M in 60 mM Na-Cacodylat-Puffer sowie bei 0.1 M, 1 und 4 M NaCl durchgeführt.

Beispiel 33

T_m -Werte der Oligonucleotide

| Oligomer | T_m [°C] |
|-------------------------------|-----------------|
| $d(A_{12}) d(T_{12})$ | 44 ^b |
| $d(c^7A_{11}A) d(T_{12})$ | 30 ^b |
| $d(Br^7c^7A_{11}A) d(T_{12})$ | 53 ^b |
| $d(Me^7c^7A_{11}A) d(T_{12})$ | 48 ^b |
| $[d(A-T)_6]_2$ | 33 ^c |
| $[d(c^7A-T)_6]_2$ | 36 ^c |
| $[d(Br^7c^7A-T)_6]_2$ | 55 ^c |
| $[d(Cl^7c^7A-T)_6]_2$ | 59 ^c |
| $[d(Me^7c^7A-T)_6]_2$ | 41 ^c |

^a) bestimmt in 1M NaCl mit 60mM Na-Cacodylat, 100 mM MgCl₂, pH 7.1

^b) Oligomerkonzentration: 7.5 μ M Einzelstrang,

^c) Oligomerkonzentration: 15 μ M Einzelstrang

Beispiel 34

Phosphodiester-Hydrolyse der selbstkomplementären Oligonucleotide 28–38 mit der Endodesoxyribonuclease EcoRI

0.5 A₂₆₀-Einheiten des entsprechenden Oligonucleotids werden in 100 μ l Puffer (bestehend aus 50 μ M Tris-HCl-Puffer pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM Magnesiumchlorid und 1 mM Dithioerythrol) gelöst und mit Endodesoxyribonuclease EcoRI (high concentration, 5 μ l = 250 Einheiten) versetzt. Anschließend wurde bei 37°C inkubiert und in Zeitabständen von 30 min. Proben von jeweils 10 μ l Volumen entnommen und mit Hilfe der Reverse-Phase-HPLC analysiert (Laufmittelsystem II).

Beispiel 35

Überprüfung auf Nuclease-Stabilität

10 nmol des zu untersuchenden Oligonucleotids werden in 450 μ l 20%-igem fötalem Kälberserum in RPMI-Medium und 50 ml bidestilliertem Wasser gelöst und bei 37°C inkubiert. Dann werden sofort und nach 1, 2, 4, 7 und 24 Stunden 10 μ l Proben für die Gelelektrophorese bzw. 20 μ l Proben für die HPLC entnommen, zum Abbruch der Reaktion mit 5 μ l bzw. 10 μ l Formamid versetzt und 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Für die Gelelek-

trophorese werden die Proben auf ein 15% Polyacrylamid-Gel (2% BIS) aufgetragen und dieses bei etwa 3000 Voltstunden entwickelt. Die Banden werden durch die Silberfärbung sichtbar gemacht. Zur HPLC-Analyse werden die Proben auf eine Gen-Pak Fax HPLC Säule (Waters/Millipore) gespritzt und bei 1 ml/min mit 5 bis 50% Puffer A in B chromatographiert (Puffer A: 10mM Natrium-dihydrogenphosphat, 0,1 M NaCl in Acetonitril/Wasser 1 : 4 (v:v) pH 6,8; Puffer B: wie A, jedoch 1,5 M NaCl).

5

Beispiel 36

Testung auf antivirale Aktivität

Die antivirale Aktivität der Prüfsubstanzen gegen verschiedene humanpathogene Herpesviren wird im Zellkulturtestsystem untersucht. Für den Versuch werden Affennierenzellen (Vero, 2×10^5 /ml) in serumhaltigem Dulbecco's MEM (5% Fötale Kälberserum FCS) in 96-Napf-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das serumhaltige Medium wird dann abgesaugt und die Zellen werden zweimal mit serumfreiem Dulbecco's MEM (—FCS) überspült. Die Testsubstanzen werden in H₂O auf eine Konzentration von 600 µM vorverdünnt und bei -18°C aufbewahrt. Für den Test erfolgen weitere Verdünnungsschritte in Dulbecco's Minimal Essential Medium (MEM). Je 100 µl der einzelnen Prüfsubstanzverdünnungen werden zusammen mit 100 µl serumfreiem Dulbecco's MEM (—FCS) zu den gespülten Zellen gegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ werden die Zellen mit Herpes simplex Virus Typ 1 (ATCC VR733, HSV-1 F-strain) oder mit Herpes simplex Virus Typ 2 (ATCC VR734, HSV-2 G-Strain) infiziert in Konzentrationen, bei denen der Zellrasen innerhalb von 3 Tagen vollkommen zerstört wird. Bei HSV-1 beträgt die Infektionsstärke 500 Plaque-bildende Einheiten (PFU) pro Napf, bei HSV-2 350 PFU/Napf. Die Versuchsansätze enthalten dann Prüfsubstanz in Konzentrationen von 80 µM bis 0,04 µM in MEM, ergänzt durch 100 U/ml Penicillin G und 100 mg/l Streptomycin. Alle Versuche werden als Doppelbestimmung durchgeführt mit Ausnahme der Kontrollen, die achtfach je Platte durchgeführt werden. Die Versuchsansätze werden 17 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Cytotoxizität der Prüfsubstanzen wird nach 20 h Gesamtkubationszeit durch mikroskopische Begutachtung der Zellkulturen bestimmt. Als Dosis tolerata maxima (DTM) wird die höchste Präparatkonzentration bezeichnet, die unter den genannten Versuchsbedingungen noch keine mikroskopisch-erkennbaren Zellschädigungen hervorruft. Es erfolgt daraufhin die Zugabe von FCS auf eine Endkonzentration von 4% mit weiterer Inkubation für 55 h bei 37°C und 5% CO₂. Die unbehandelten Infektionskontrollen zeigen dann einen kompletten cytopathischen Effekt (CPE). Nach mikroskopischer Begutachtung der Zellkulturen werden diese dann mit Neutralrot entsprechend dem Vitalfärbungsverfahren nach Finter (1966) angefärbt. Die antivirale Aktivität einer Testsubstanz wird definiert als minimale Hemmkonzentration (MHK), die benötigt wird, um 30—60% der Zellen vor dem virusbedingten cytopathogenen Effekt zu schützen.

10

15

20

25

30

35

Abkürzungen:

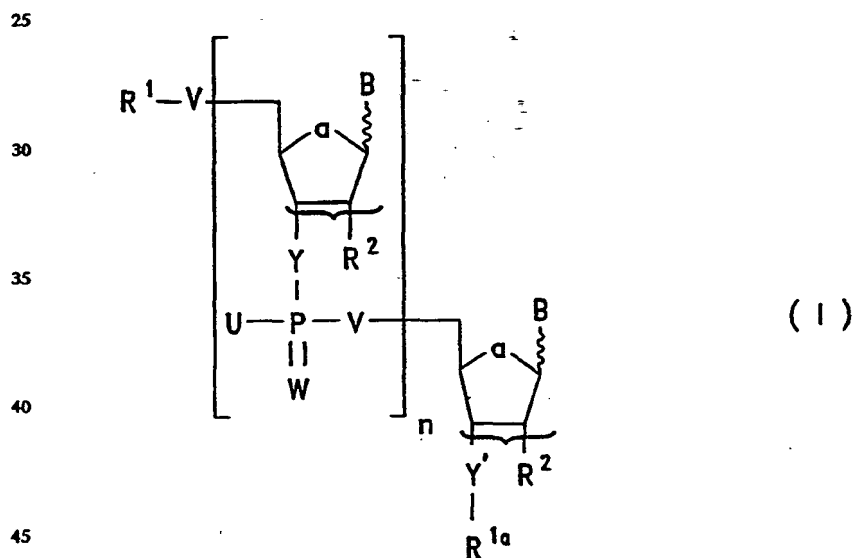
| | |
|---|----|
| Bz Benzoyl | |
| br. breit | |
| CD Circular dichroismus | 40 |
| d Duplett | |
| DC Dünnschichtchromatographie | |
| dG 2'-Desoxyguanosin | |
| dA 2'-Desoxyadenosin | |
| dC 2'-Desoxycytidin | 45 |
| dT 2'-Desoxythymidin | |
| (D ₆)DMSO Dimethylsulfoxid, 6-fach deuteriert | |
| DMF Dimethylformamid | |
| DNA Desoxyribonucleinsäure | |
| Dmt 4,4'-Dimethoxytrityl, (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl) | 50 |
| EDTA Ethylendiamintetraacetat | |
| EtOAc Ethylacetat | |
| Et ₃ N Triethylamin | |
| FC Flashchromatographie | |
| G Freie Enthalpie | 55 |
| Gef. gefunden | |
| getr. getrocknet | |
| h Stunde | |
| H Enthalpie der Duplexbildung | |
| HPLC Hochdruckflüssigkeitschromatographie | 60 |
| Hyp. Hypochromizität | |
| ibu Isobuturyl | |
| J Kopplungskonstante | |
| K _m Michaelis-Menten-Konstante | |
| NMR Kernmagnetische Resonanz | 65 |
| PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese | |
| PCR Polymerase chain reaction | |
| ppm parts per million | |

2-PrO H Isopropanol
Rf Retention bei der DC relativ zur Laufmitt lfront
RNA Ribonucleinsäure
RP Reverse-Phase

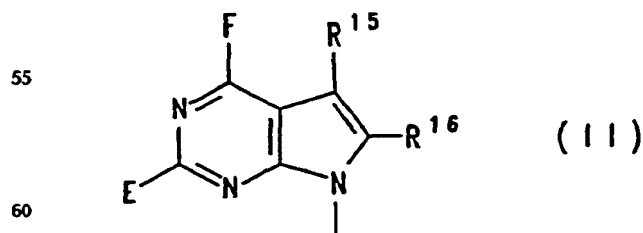
- 5 s Singulett
- S Enthalpie der Duplexbildung
- Smp. Schmelzpunkt
- SVPD Schlangengift-Phosphodiesterase
- t Triplett
- 10 TBK Triethylammoniumbicarbonat
- T_m Schmelztemperatur bei Oligomeren
- UV Ultraviolett
- v_{max} maximale Reaktionsgeschwindigkeit
- c'A 7-Desazaadenosin
- 15 Br⁷c' 7-Brom-7-Desazaadenosin
- Cl⁷c' 7-Chlor-7-Desazaadenosin
- Me⁷c' 7-Methyl-7-Desazaadenosin
- λ Wellenlänge
- ε molarer Extinktionskoeffizient

Patentansprüche

1. Oligonucleotid der Formel I



sowie dessen physiologisch verträglichen Salze worin B unabhängig voneinander eine in der Nukleotidchemie übliche Base bedeutet und mindestens ein B eine Base der Formel II bedeutet



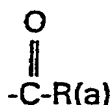
Worin
 R^{15} und R^{16} unabhängig voneinander

1. Wasserstoff
2. Halogen,
3. (C₁—C₁₀)-Alkyl,
4. (C₂—C₁₀)-Alkenyl,

5. (C₂—C₁₀)-Alkynyl,
6. NO₂,
7. NH₂,
8. Cyano,
9. —S—(C₁—C₆)-Alkyl,
10. (C₁—C₆)-Alkoxy
11. (C₆—C₂₀)-Aryloxy
12. SiH₃
- 13.

5

10



15

14. einen wie unter 3, 4, oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, S—(C₁—C₆)-Alkyl, (C₁—C₆)-Alkoxy, OH, —NR(c)R(d), —CO—R(b), —NH—CO—NR(c)R(d), —NR(c)R(g), —NR(e)R(f), —NR(e)R(g) oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel 20
 $-\text{[O}-(\text{CH}_2)_r-\text{NR(c)R(d)]}_s$ wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1—18, bevorzugt 1—6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, —CO—R(b), —NH—CO—NR(c)R(d), —NR(c)R(d), —NR(e)R(f), —NR(e)R(g) oder —NR(c)R(g) zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder
 15. einen wie unter 3, 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet.

R(a) OH, (C₁—C₆)-Alkoxy, (C₆—C₂₀)-Aryloxy, NH₂ oder NH—T bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sind, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,

R(b) Hydroxyl, (C₁—C₆)-Alkoxy, oder —N(R(c)R(d)) bedeutet,
 R(c) und R(d) unabhängig voneinander H, (C₁—C₆)-Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit —NR(e)R(f) oder —NR(e)R(g) bedeuten,

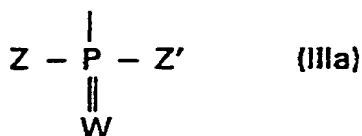
R(e) und R(f) unabhängig voneinander H oder (C₁—C₆)-Alkyl bedeuten,

R(g) (C₁—C₆)-Alkyl-COOH bedeutet

mit der Maßgabe, daß R¹⁵ und R¹⁶ nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO₂, NH₂, Cyano oder SiH₃ sein können,

E und F unabhängig voneinander H, OH oder NH₂ bedeuten,

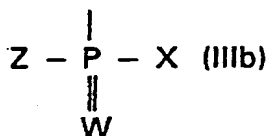
R¹ Wasserstoff, C₁—C₁₈-Alkyl, C₂—C₁₈-Alkenyl, C₂—C₁₈-Alkynyl, C₂—C₁₈-Alkylcarbonyl, C₃—C₁₉-Alkenylcarbonyl, C₃—C₁₉-Alkylcarbonyl, (C₆—C₁₄)-Aryl-(C₁—C₈)-alkyl, eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe oder einen Rest der Formel IIIa



50

bedeutet;

R^{1a} Wasserstoff, C₁—C₁₈-Alkyl, C₂—C₁₈-Alkenyl, C₂—C₁₈-Alkynyl, C₂—C₁₈-Alkylcarbonyl, C₃—C₁₉-Alkenylcarbonyl, C₃—C₁₉-Alkylcarbonyl, (C₆—C₁₄)-Aryl-(C₁—C₈)-alkyl, oder einen Rest der Formel IIIb



60

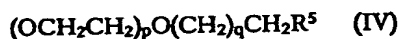
bedeutet;

R² Wasserstoff, Hydroxy, C₁—C₁₈-Alkoxy, C₁—C₆-Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, Halogen, Azido oder NH₂ bedeutet;

a für Oxy, Sulfanidyl oder Methylen steht;

65

n eine ganze Zahl ≥ 1 bedeutet;
 W Oxo, Thioxo oder Selenoxo bedeutet;
 V Oxy, Sulfandiyl oder Imino bedeutet;
 Y Oxy, Sulfandiyl, Imino oder Methylen bedeutet;
 5 Y' Oxy, Sulfandiyl, Imino, $(CH_2)_m$ oder $V(CH_2)_m$ ist, worin
 m eine ganze Zahl von 1 bis 18 bedeutet;
 X Hydroxy oder Mercapto bedeutet;
 U Hydroxy, Mercapto, SeH, C_1-C_{18} -Alkoxy, C_1-C_{18} -Alkyl, C_6-C_{20} -Aryl, (C_6-C_{14}) -Aryl- (C_1-C_6) -alkyl,
 NHR^3 , NR^3R^4 oder einen Rest der Formel IV



bedeutet, worin

R^3 C_1-C_{18} -Alkyl, C_6-C_{20} -Aryl, (C_6-C_{14}) -Aryl- (C_1-C_6) -alkyl, $2-(CH_2)_c-[NH(CH_2)_d]-NR^6R^6$, worin c
 15 eine ganze Zahl von 2 bis 6 und d eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, und R^6 unabhängig voneinander
 Wasserstoff oder C_1-C_6 -Alkyl oder C_1-C_4 -Alkoxy- C_1-C_6 -alkyl ist; R^4 C_1-C_{18} -Alkyl, C_6-C_{20} -Aryl oder
 (C_6-C_{10}) -Aryl- (C_1-C_6) -alkyl bedeutet oder im Falle von NR^3R^4 zusammen mit R^3 und dem sie tragenden
 Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterozyklischen Ring bedeutet, der zusätzlich ein weiteres Hetero-
 atom aus der Reihe O, S, N enthalten kann,

p eine ganze Zahl von 1 bis 100 ist,

g eine ganze Zahl von 0 bis 22 ist,

R^5 Wasserstoff oder eine funktionelle Gruppe wie beispielsweise Hydroxy, Amino, C_1-C_{18} -Alkylamino,
 COOH, $CONH_2$, $COO(C_1-C_4)$ -Alkyl oder Halogen bedeutet;

25 Z und Z' unabhängig voneinander Hydroxy, Mercapto, SeH, C_1-C_{22} -Alkoxy, $-O-(CH_2)_b-NR^6R^7$, worin
 b eine ganze Zahl von 1 bis 6 ist, und R^7 C_1-C_6 -Alkyl ist oder R^6 und R^7 zusammen mit dem sie tragenden
 Stickstoffatom einen 3-6-gliedrigen Ring bilden, C_1-C_{18} -Alkyl, C_6-C_{20} -Aryl, (C_6-C_{14}) -Aryl- (C_1-C_6) -al-
 kyl, (C_6-C_{14}) -Aryl- (C_1-C_6) -alkoxy, wobei Aryl auch Heteroaryl bedeutet und Aryl gegebenenfalls durch 1,
 2 oder 3 gleiche oder verschiedene Reste aus der Reihe Carboxy, Amino, Nitro, C_1-C_4 -Alkylamino,
 C_1-C_6 -Alkoxy, Hydroxy, Halogen und Cyano substituiert ist, C_1-C_{18} -Alkylmercapto, NHR^3 , NR^3R^4 , einen
 30 Rest der Formel IV oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigt oder als
 Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons
 an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift, und
 die geschweifte Klammer andeutet, daß sich R^2 und der benachbarte Phosphoryl-Rest in 2'- und 3'-Stellung
 oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können,

35 wobei jedes Nucleotid in seiner D- bzw. L-Konfiguration vorliegen kann und sich die Base B in α - bzw.
 β -Stellung befinden kann,

mit der Maßgabe, daß Y, Y', X, V, und W nicht alle Oxo und U nicht Hydroxy bedeuten wenn E = OH oder
 NH_2 und F = OH ist, R^{16} Wasserstoff ist und R^{15} Br, Cl, F, Cyano, (C_1-C_4) -Alkyl, (C_2-C_4) -Alkenyl oder
 (C_2-C_4) -Alkynyl bedeutet.

40 2. Oligonucleotid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Base B in β -Stellung befindet, die
 Nucleotide in der D-Konfiguration vorliegen, R^2 sich in 2'-Stellung befindet, a für Oxy steht und n eine
 ganze Zahl von 2-99 bedeutet.

3. Oligonucleotid gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß

R^1 Wasserstoff, C_1-C_6 -Alkyl, insbesondere Methyl, oder einen Rest der Formel IIIa bedeutet;

45 R^{1a} Wasserstoff, C_1-C_6 -Alkyl, insbesondere Methyl, oder einen Rest der Formel IIIb bedeutet;

R^2 Wasserstoff, C_1-C_6 -Alkoxy, C_1-C_6 -Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, oder Hydroxy, insbesondere
 Wasserstoff, bedeutet;

n eine ganze Zahl von 4 bis 39, insbesondere 5 bis 29, bedeutet;

m eine ganze Zahl von 1 bis 6, insbesondere 1, bedeutet;

50 U Hydroxy, Mercapto, C_1-C_6 -Alkoxy, C_1-C_6 -Alkyl, NR^3R^4 oder NHR^3 , insbesondere Hydroxy oder
 C_1-C_6 -Alkyl, bedeutet, worin

R^3 C_1-C_6 -Alkyl, bevorzugt C_1-C_4 -Alkyl, oder Methoxyethyl ist, und B, W, V, Y, Y', X und Z die in
 Anspruch 1 aufgeführte Bedeutung haben.

4. Oligonucleotid gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß V, Y
 55 und Y' die Bedeutung von Oxy, Sulfandiyl oder Imino haben.

5. Oligonucleotid gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß W die
 Bedeutung von Oxo oder Thioxo hat.

6. Oligonucleotid gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß U die
 Bedeutung von Hydroxy, Methyl oder Mercapto hat.

60 7. Oligonucleotid gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß R^1
 und/oder R^{1a} für Wasserstoff steht.

8. Verfahren zur Herstellung der Oligonucleotide der Formel I sowie dessen physiologisch verträglichen
 Salze nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß man sukzessive ein Nucleotid mit
 jeweils einer Nucleobase an einen entsprechenden derivatisierten Träger oder an eine wachsende Oligo-
 merkette ankondensiert.

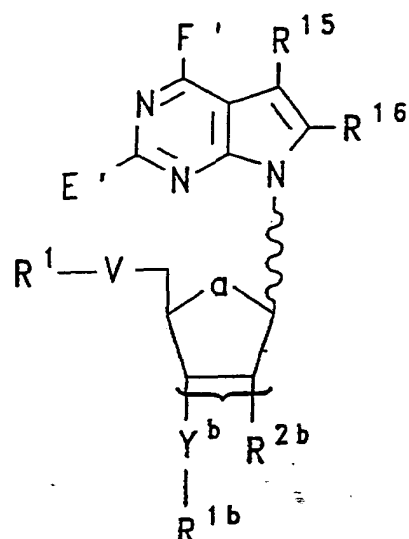
65 9. V rwendung der Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 1-7 zur Herstellung eines Arzneimittels
 oder Diagnostikums.

10. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels oder Diagnostikums, dadurch gekennzeichnet, daß min-

destens ein Oligonucleotid nach einem der Ansprüche 1–7 mit einem physiologisch annehmbaren Träger sowie gegebenenfalls geeigneten Zusatzstoffen und/oder Hilfsstoffen vermischt wird.

11. Arzneimittel oder Diagnostikum, enthaltend eine oder mehrere der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1–7, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch annehmbaren Träger und/oder Hilfsstoffen.

12. Nucleotidmonomer der Formel V



(V)

worin

V Oxy, Sulfandiyl oder Imino ist;

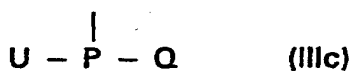
Y^b Oxy, Sulfandiyl oder Methylen ist;

a für Oxy, Sulfandiyl oder Methylen steht;

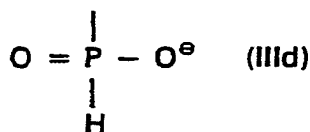
R^{2b} Wasserstoff, OR¹², C₁–C₁₈-Alkoxy, C₁–C₆-Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, Halogen, Azido oder NR¹⁰R¹¹ bedeutet;

R¹ eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe bedeutet;

R^{1b} ein Succinylrest ist, der über eine Amid- oder Methylimidbindung mit einem amino- oder methylamino-funktionalisierten Träger verknüpft ist, oder einen Rest der Formel IIIc oder III d bedeutet



(IIIc)



(III d)

worin

U (C₁–C₁₈)-Alkoxy, (C₁–C₁₈)-Alkyl, (C₆–C₂₀)-Aryl, (C₆–C₁₄)-Aryl-(C₁–C₈)-Alkyl, O–R⁷, S–R⁷ oder einen Rest der Formel IV

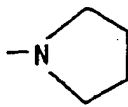
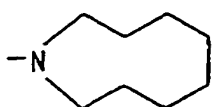


worin R⁵ gleich H ist, bedeutet;

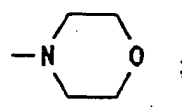
Q einen Rest –NR⁸R⁹ bedeutet

R⁷ –(CH₂)₂–CN bedeutet;

R⁸ und R⁹ gleich oder verschieden sind und C₁–C₆-Alkyl, insbesondere Isopropyl oder Ethyl bedeuten oder zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5–9-gliedrigen heterozyklischen Ring bedeuten, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann, insbesondere



oder



E' und F' unabhängig von inander H, OR¹² oder NR¹⁰R¹¹ bedeuten,

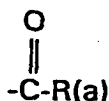
R¹⁰ und R¹¹ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine in der Nukleotidchemie übliche Aminoschutzgruppe bedeuten oder R¹⁰ und R¹¹ gemeinsam eine in der Nukleotidchemie übliche Amino-

schutzgruppe bilden;

R¹² Wasserstoff oder eine in der Nukleotidchemie übliche Hydroxylschutzgruppe, wie beispielsweise t-Butyl-dimethyl-silyl, Triisopropyl-silyl, o-nitro-Benzyl, p-nitro-Benzyl oder 2-Fluorphenyl-4-methoxypiperidin-4-yl (FPMP) bedeutet;

R¹⁵ und R¹⁶ unabhängig voneinander

1. Wasserstoff
2. Halogen,
3. (C₁–C₁₀)-Alkyl,
4. (C₂–C₁₀)-Alkenyl,
5. (C₂–C₁₀)-Alkynyl,
6. NO₂,
7. NH₂,
8. Cyano,
9. –S–(C₁–C₆)-Alkyl,
10. (C₁–C₆)-Alkoxy
11. (C₆–C₂₀)-Aryloxy
12. SiH₃
- 13.



14. einen wie unter 3., 4., oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, S–(C₁–C₆)-Alkyl, (C₁–C₆)-Alkoxy, OH, –NR(c)R(d), –CO–R(b), –NH–CO–NR(c)R(d), –NR(c)R(g), –NR(e)R(f), –NR(e)R(g) oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel –[O–(CH₂)_r–]_s–NR(c)R(d), wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1–18, bevorzugt 1–6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, –CO–R(b), –NH–CO–NR(c)R(d), –NR(c)R(d), –NR(e)R(f), –NR(e)R(g) oder –NR(c)R(g) eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe tragen oder mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder

15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet.

R(a) OH, (C₁–C₆)-Alkoxy, (C₆–C₂₀)-Aryloxy, NH₂ oder NH–T bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sind, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,

R(b) Hydroxyl, (C₁–C₆)-Alkoxy, oder –N(R(c)R(d)) bedeutet, R(c) und R(d) unabhängig voneinander H, (C₁–C₆)-Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit –NR(e)R(f) oder –NR(e)R(g) bedeuten,

R(e) und R(f) unabhängig voneinander H oder (C₁–C₆)-Alkyl bedeuten,

R(g) (C₁–C₆)-Alkyl-COOH bedeutet

mit der Maßgabe, daß R¹⁵ und R¹⁶ nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO₂, NH₂, Cyano oder SiH₃ sein können,

wobei funktionelle Gruppen wie OH, NH₂ oder COOH gegebenenfalls mit einer in der Nukleotidchemie üblichen Gruppe geschützt sind,

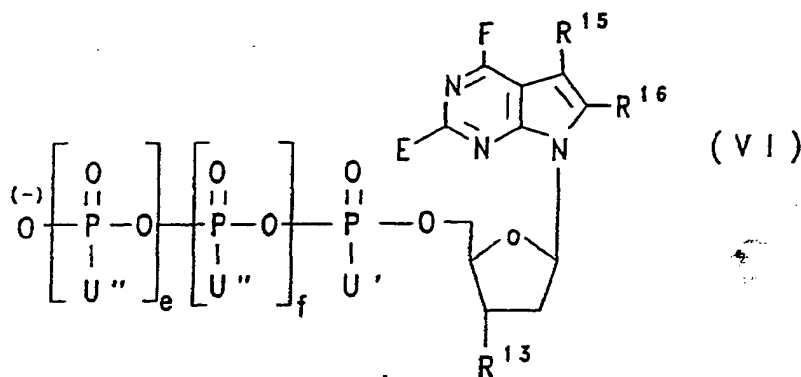
die geschweifte Klammer andeutet, daß sich R² und der benachbarte Phosphor(III)rest in 2'- und 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können,

mit der weiteren Maßgabe, daß Y^b und V nicht Oxy ist wenn E' = OR¹² oder NR¹⁰R¹¹ und F' = OR¹² ist und R¹⁶ Wasserstoff ist und R¹⁵ Br, Cl, F, Cyano, (C₁–C₄)-Alkyl, (C₂–C₄)-Alkenyl oder (C₂–C₄)-Alkynyl bedeutet.

13. Verfahren zur Herstellung eines Nucleotidmonomers der Formel V gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die korrespondierenden Nucleosidmonomere der Formel V nach Einführung geeigneter Aminoschutzgruppen bzw. Hydroxylschutzgruppen in die entsprechenden Phosphonat- oder Phosphoramiditderivate übergeführt werden.

14. Verwendung eines Nucleotidmonomers gemäß Anspruch 12 zur Herstellung von Oligonukleotiden, die zusammen mit ihren Target-Nucleinsäuren stabile Hybridisierungskomplexe bilden.

15. Verbindung der Formel VI



worin unabhängig voneinander

$U' = U'' = U'''$ gleich Hydroxyl oder Mercapto ist;

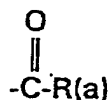
e und f 0 oder 1 bedeuten;

R^{13} Wasserstoff, OH, C_1-C_{18} -Alkoxy, C_1-C_6 -Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, bedeutet;

E und F unabhängig voneinander H, OH oder NH_2 bedeuten;

R^{15} und R^{16} unabhängig voneinander

1. Wasserstoff
2. Halogen,
3. (C_1-C_{10}) -Alkyl,
4. (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
5. (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
6. NO_2 ,
7. NH_2 ,
8. Cyano,
9. $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl,
10. (C_1-C_6) -Alkoxy
11. (C_6-C_{20}) -Aryloxy
12. SiH_3
- 13.



14. einen wie unter 3., 4., oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, $S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, (C_1-C_6) -Alkoxy, OH, $-NR(c)R(d)$, $-CO-R(b)$, $-NH-CO-NR(c)R(d)$, $-NR(c)R(g)$, $-NR(e)R(f)$, $-NR(e)R(g)$ oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel $-[O-(CH_2)_r]_s-NR(c)R(d)$, wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, $-CO-R(b)$, $-NH-CO-NR(c)R(d)$, $-NR(c)R(d)$, $-NR(e)R(f)$, $-NR(e)R(g)$ oder $-NR(c)R(g)$ zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder
15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet.

$R(a)$ OH, (C_1-C_6) -Alkoxy, (C_6-C_{20}) -Aryloxy, NH_2 oder $NH-T$ bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sind, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,

$R(b)$ Hydroxyl, (C_1-C_6) -Alkoxy, oder $-N(R(c)R(d))$ bedeutet,

$R(c)$ und $R(d)$ unabhängig voneinander H, (C_1-C_6) -Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit $-NR(e)R(f)$ oder $-NR(e)R(g)$ bedeuten,

$R(e)$ und $R(f)$ unabhängig voneinander H oder (C_1-C_6) -Alkyl bedeuten,

$R(g)$ (C_1-C_6) -Alkyl-COOH bedeutet

mit der Maßgabe, daß R^{15} und R^{16} nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO_2 , NH_2 , Cyano oder SiH_3 sein können,

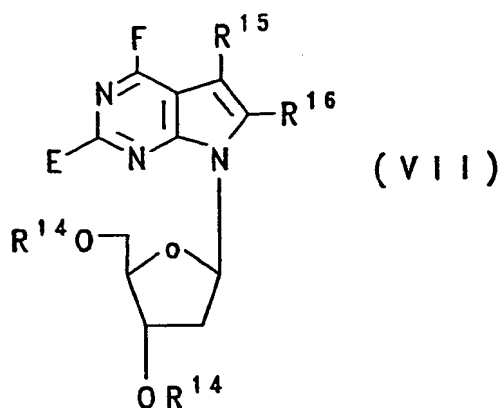
wobei Verbindungen der Formel VI ausgenommen sind in denen R^{16} gleich H ist und R^{15} (C_2-C_{10}) -Alkynyl,

substituiert mit $-\text{NR}(c)\text{R}(d)$ oder $-\text{NR}(e)\text{R}(f)$ bedeutet;

und d r weiteren Maßgabe, daß e und f nicht 0 sind, wenn E = OH oder NH_2 und F = OH ist, R^{16} Wasserstoff ist und R^{15} Br, Cl, F, Cyano, (C_1-C_4) -Alkyl, (C_2-C_4) -Alkenyl oder (C_2-C_4) -Alkynyl bedeutet.

16. Verwendung eines Nucleotidmonomers der Formel VI gemäß Anspruch 15 als Hilfsmittel in der Molekularbiologie.

17. Verbindung der allgemeinen Formel VII



worin

E und F unabhängig voneinander H, OH oder NH_2 bedeuten und OH und NH_2 gegebenenfalls mit einer in der Nukleotidchemie üblichen Schutzgruppe geschützt sind;

R^{15} und R^{16} unabhängig voneinander Wasserstoff, $(\text{C}_5-\text{C}_{10})$ -Alkyl, $(\text{C}_5-\text{C}_{10})$ -Alkenyl, $(\text{C}_5-\text{C}_{10})$ -Alkynyl, J, Cl, Br, F oder Cyano bedeuten, wobei R^{15} und R^{16} nicht gleichzeitig Wasserstoff sein können, wobei ferner R^{15} nicht Wasserstoff, Cl, Br oder Cyano sein kann wenn R^{16} und E Wasserstoff und F NH_2 bedeuten, und der weiteren Maßgabe, daß R^{15} nicht J ist, wenn R^{16} Wasserstoff, E NH_2 und F OH bedeutet,

R^{14} unabhängig voneinander H oder eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe bedeutet.

18. Verwendung von 7-Desazapurinnukleotiden, die an der 7- und/oder 8-Position substituiert sind, zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.

